

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY

FOOD SCIENCES

4

ROČNÍK 15
PRAHA 1997
CS ISSN 0862-8653

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Abstracts from the journal is comprised in Agrindex of FAO (AGRIS database), Food Science and Technology Abstracts, Dairy Science Abstracts, Chemical Abstracts, PASCAL – CD-ROM (INIST), WLAS, TOXILINE PLUS and Czech Agricultural Bibliography.

Editorial board – Redakční rada

Head of the Editorial Board – Předseda

Ing. Zeno Šimůnek, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Miloslav Adam, CSc., Ing. Luisa Benešová, prof. Ing. Dušan Čurda, CSc., prof. Ing. Jiří Davídek, DrSc., Ing. Jan Drbohav, CSc., Ing. Jiřina Houšová, CSc., prof. Ing. Ivo Ingr, DrSc., prof. Ing. Jan Pokorný, DrSc., prof. Ing. Mojmír Rychtera, CSc., Ing. Olga Štiková, CSc., MUDr. Bohumil Turek, CSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Prof. Dr. Werner Baltes (Germany), Dr. Reto Battaglia (Switzerland), Ing. Milan Kováč, CSc. (Slovak Republic), Prof. Dr. Halina Kozłowska (Poland), Prof. Dr. Radomir Lásztity (Hungary), O. Univ. Prof. Dr. Werner Pflannhauser (Austria), Prof. Ing. Alexander Příbela, DrSc. (Slovak Republic)

Editor-in-chief – Vedoucí redaktorka

RNDr. Marcela Braunová

Aim and scope: The journal publishes original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing knowledge in the given field. Published papers are in Czech, Slovak or English.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year and should be sent to the contact address.

Subscription price for 1997 is 306 Kč, 76 USD (Europe) and 80 USD (overseas)

Periodicity: The journal is published six times a year.

Contact address: Slezská 7, 120 56 Prague 2, Czech Republic,
tel.: 00 420 2 251 098; fax: 00 420 2 242 539 38; e-mail: fofo@uzpi.cz

© Institute of Agricultural and Food Information, Prague 1997 MK ČR 6696

DETERMINATION OF MICROBIAL CONTAMINATION IN MILK BY ATP ASSAY*

Stefano GIROTTI, Elida N. FERRI, Fabiana FINI, Simona RIGHETTI,
Luca BOLELLI, Rolando BUDINI, Graziella LASI¹, Petr ROUBAL²,
Ladislav FUKAL³, Igor HOCHÉL³, Pavel RAUCH³

University of Bologna – Department of Chemical Sciences, Bologna;

¹Granarolo S.p.A., Bologna, Italy; ²MILCOM – Dairy Research Institute, Prague;

³Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology,
Prague, Czech Republic

Abstract: The simple, fast and sensitive bioluminescent assay for the determination of adenosine-5'-triphosphate (ATP) was applied to measure the bacterial contamination in milk. To perform the assay and to obtain better results, a filtration step was used and two different devices, a funnel and the Biofiltration System from Lumac-Perstop, were compared. Somatic cells were disrupted before the filtration step and the filter with bacterial cells was directly tested with the extraction solution and the luciferin-luciferase system. The luminescent method enables to detect 10^5 – 10^4 microbial cells per ml of milk. The microbiological quality of the milk samples (number of bacterial cells per ml) was also assessed by an automatic method (Bacto-Scan 8000) and the results were in good agreement with those obtained by the bioluminescent method: $y = 0.048x + 0.0007$, $r = 0.930$, $n = 32$.

microbial contamination; milk; adenosine-5'-triphosphate; bioluminescence; firefly luciferase

Traditional microbiological assays are time-consuming and require 24–72 h before the results are available. This means that the results are often only of retrospective interest. Nowadays, in the food technology it is necessary to have rapid and reliable microbiological answers to meet the demands and efficiency required for process control. Actually, the absence of assays easy to implement and of simple operating leads to delays and difficulties in the

* This work was supported by grant of European Community No CIPA CT94-0147 and MURST.

discovery of milk contamination sources, with consequent rise of hygienical risks and economic losses when unsuitable milk is used in dairy plant.

Therefore, there is an increasing demand from the dairy industry for rapid methods of assessing the bacteriological quality of incoming raw milk. Such methods must enable quality managers to quickly identify milk with a bacterial concentration above 100 000 cells/ml, in order to meet European regulations (Anonymous, 1992) and internal quality standards.

The highly sensitive ATP bioluminescence technique has been known for a long time, but it has not yet fulfilled its potential as a rapid method for food microbiology. Different tests based on ATP bioluminescence were developed for this purpose (Bossuyt, 1981) but they lacked sensitivity because of the presence of large amounts of non-bacterial ATP in raw milk, originating from somatic cells or present as free ATP, possibly associated with casein micelles (Richardson et al., 1980). Moreover, sample preparation procedures for this detection method are laborious. Measurement was also hindered by the quenching effect of milk on luminescence triggered by firefly luciferase (Botha, 1985).

To lower the ATP background and to improve selectivity by isolating the bacteria from milk, new methods have recently been developed, based either on filtration (Crombrugge et al., 1989) or on centrifugation (Pahuski et al., 1991). However, during practical trials, most of these protocols were found cumbersome and labour-intensive. In recent years, new efforts have therefore been made (Reybroeck, Schram, 1995) to develop a more user-friendly semi-automatic ATP filtration method.

The aim of this study was to apply a simple, fast and enough sensitive method for microbiological contamination control of milk samples.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Luciferin-luciferase solution LDR bioluminescent reagent and bacterial extraction solution ATP releasing agent (ARA) were from Celsis Ltd. (Cambridge, UK). Somatic extraction solution Somalite II was purchased from Bouty (Milan, Italy). All other chemicals were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy).

Washing solution (Ringer) was 38.8mM NaCl, 6mM MgCl₂, 20mM KCl, 5mM Hepes buffer pH 7.75 in bidistilled water.

Minifilters (diameter 0.8 cm; porosity 0.8 μm) were from Pall (Portsmouth, Great Britain) and LUMAC (Landgraaf, The Netherlands). The Biofiltration System was kindly supplied by LUMAC.

All measurements were performed with the LKB 1250 Luminometer from Wallac (Turku, Finland), with the LB 9500 C from Berthold (Wildbald, Germany) or with the Victor 1420 Multilabel Counter from Wallac.

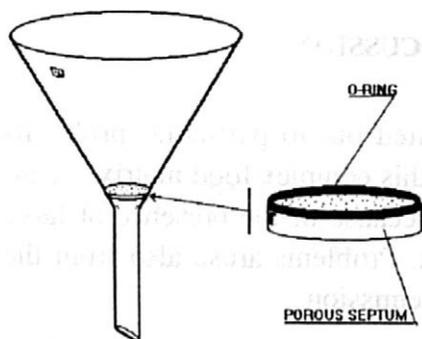
Bacterial cells (*E. coli*, *B. subtilis*, *B. aureus*) were also determined with Bacto-Scan 8000, Foss-Electric Company (Copenhagen, Denmark).

Principle

The principle of the developed bioluminescent assay was as follows. The determination of bacterial content in raw milk is based on the measurement of intracellular ATP after the concentration of microorganisms by filtration. Mainly bacterial and somatic cells remain on the filter. To remove somatic ATP, an extractor able to disrupt somatic cells but not bacterial ones is added. The filter is then washed to remove residual ATP in solution and bacteria are disrupted by adding a more efficient extractor. Bacterial ATP is finally determined after addition of a luciferin-luciferase solution. Light emission is immediately measured. The content of ATP is calculated with reference to a calibration curve.

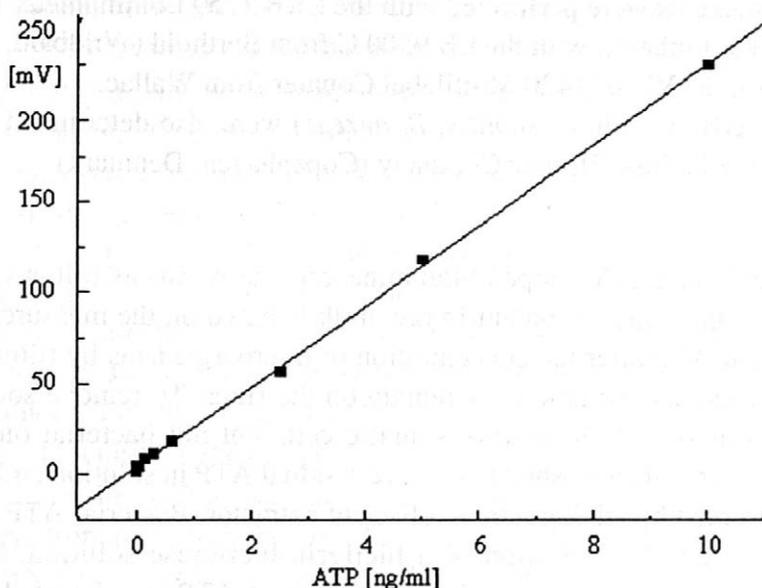
Procedure

Raw milk (0.15 ml for the biofiltration assay and 1 ml for the manual assay) was diluted with the same volume of a non-ionic surfactant solution (Somalite) to obtain the lysis of somatic cells and the release of ATP. The sample was then filtered by vacuum filtration on a 0.8 μm Millipore minifilter located in a glass filtration funnel with a glass porous septum (Fig. 1) or by the Biofiltration System. The filter was then washed with 0.6 ml of Ringer solution to wash away somatic and free ATP and transferred to



1. Glass filtration funnel with a glass porous septum

a flat-bottomed cuvette. The bacterial extractant, 0.2 ml of ARA, was added onto the filter and gently shaken. After 30 s from the addition of the bacterial extractants, 0.1 ml of the luciferine-luciferase solution was added and the emitted light immediately recorded. ATP content was determined with reference to a calibration curve (Fig. 2).



2. Calibration curve for the bioluminescent detection of ATP. The light emission was measured with the luminometer Wallac LKB 1250 and reported in mV. Statistical parameters were: $y = 3.81x + 22.21$, $r = 0.999$, $n = 9$

RESULTS AND DISCUSSION

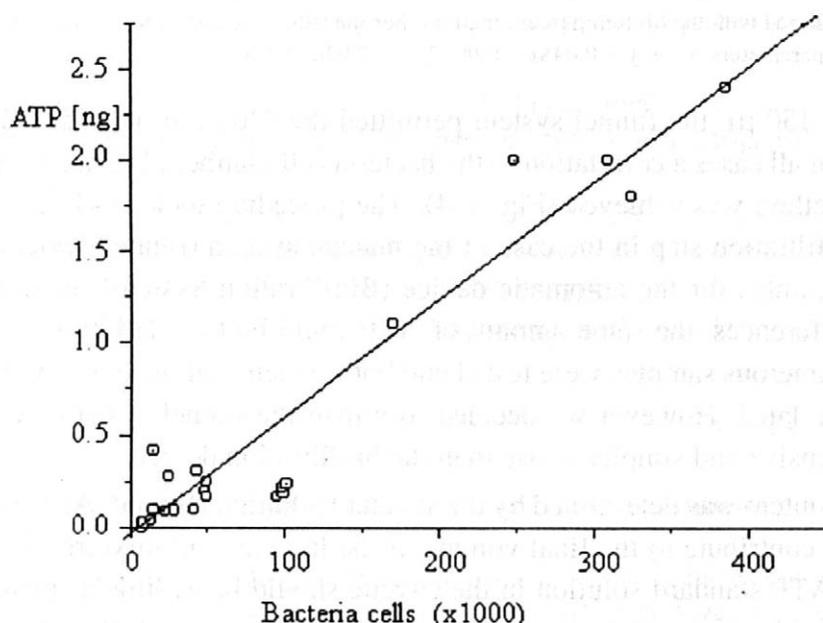
The determination of ATP in milk pointed out to particular problems which are encountered when working with this complex food matrix. As already said, the systems lacked sensitivity because of the presence of large amounts of non-bacterial ATP in raw milk. Problems arose also from the quenching effect of milk on luciferase light emission.

To lower the background and to improve selectivity, it was decided to isolate the bacteria from milk. The filtration was performed both with the funnel device and the Biofiltration system. A vacuum device was used in both cases.

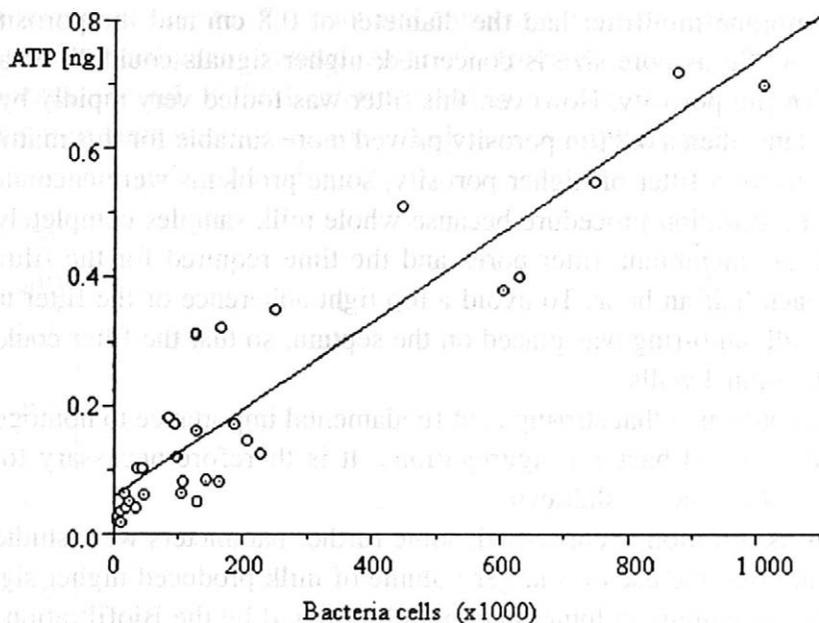
The membrane minifilter had the diameter of 0.8 cm and the porosity of 0.8 μm . As far as pore size is concerned, higher signals could be obtained with a 0.6 μm porosity. However, this filter was fouled very rapidly by fats and proteins, then a 0.8 μm porosity proved more suitable for this matrix. In spite of using a filter of higher porosity, some problems were encountered during the filtration procedure because whole milk samples completely obstructed the membrane filter pores and the time required for the filtration could reach half an hour. To avoid a too tight adherence of the filter to the funnel wall, an o-ring was placed on the septum, so that the filter could not touch the funnel walls.

It was confirmed that stirring is of fundamental importance to homogenize fats and to avoid bacterial aggregations. It is therefore necessary to mix samples before each withdrawn.

As far as filtration is concerned, some further parameters were studied. It was found that the use of a larger volume of milk produced higher signals. While the maximum volume that could be filtered by the Biofiltration Sys-



3. Comparison between the number of bacteria determined with Bacto-scan and the content of ATP determined with the bioluminescent method. For the filtration, the Biofiltration device was used. Statistical parameters were: $y = 0.075x + 0.006$, $r = 0.958$, $n = 23$



4. Comparison between the number of bacteria determined with Bacto-scan and the content of ATP determined with the bioluminescent method. For the filtration the funnel device was used. Statistical parameters were: $y = 0.048x + 0.0007$, $r = 0.930$, $n = 32$

tem was 150 μ l, the funnel system permitted the filtration of 0.15, 0.5 and 1.0 ml. In all cases a correlation to the bacteria cell number obtained by automatic method was achieved (Fig. 3–4). The procedure took 10–15 minutes per one filtration step in the case of the manual system (funnel device) and 25–30 minutes for the automatic device (Biofiltration System). In spite of these differences, the same amount of ATP could be revealed by both systems. Numerous samples were tested and both systems allowed to get results well correlated. However we decided to utilize the funnel system quicker, less expensive and simpler to use than the biofiltration device.

ATP content was determined by the standard addition method. As the filter does not contribute to the final volume of the luminescent mixture, the volume of ATP standard solution in the cuvette should be as little as possible. For the calibration curve, it was therefore decided to use 10 μ l of standard ATP solution in the concentration range 1–10 ng/ml. The final luminescent mixture was obtained using 190 μ l of extraction solution and 100 μ l of luciferin-luciferase solution.

Acknowledgement

We would like to thank CIRB (Centro Interdipartimentale di Ricerche Biotecnologiche) for the use of Victor luminometer and Lumac Perstop for the gift of the Biofiltration device.

R e f e r e n c e s

- ANONYMUS: EEC, Council Directive 92/46/EEC of June 1992 laying down the health rules for the production and placing on the market of raw milk, heat-treated milk, and milk-based products. Off. J. Europ. Commun., 14.09.92, No L268 (1992): 1–32.
- BOSSUYT, R.: Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft*, 36, 198: 257–260.
- BOTHA, W. C.: The application of the adenosine triphosphate test for the assessment of the bacteriological quality of bulk milk. M.Sc. (Agric.) thesis, Bloemfontein, SA, 1985: 1–96.
- PAHUSKI, E. – MARTIN, L. – STEBNITZ, K. – PRIEST, J. – DIMOND, R.: Rapid concentration procedure for microorganisms in raw milk. (Abstract). *J. Food Protect.*, 54, 1991: 813.
- REYBROECK, W. – SCHRAM, E.: Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate. *Neth. Milk Dairy J.*, 49, 1995: 1–14.
- RICHARDSON, T. – MCGANN, T. C. A. – KEARNEY, R. D.: Levels and location of adenosine-5'-triphosphate in bovine milk. *J. Dairy Res.*, 47, 1980: 91–96.
- VAN CROMBRUGGE, J. – WAES, G. – REYBROECK, W.: The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 43, 1989: 347–354.

Received April 3, 1997

Stanovení mikrobiální kontaminace mléka pomocí stanovení ATP

K měření bakteriální kontaminace mléka bylo použito jednoduché, rychlé a citlivé bioluminescenční stanovení adenosin-5'-trifosfátu (ATP). Sestává z narušení buněčné stěny buněk v testovaném vzorku, filtrace na membránovém filtru nebo biofiltračním systému Lumac-Perstop a následné aplikace extrakčního roztoku a systému liciferin-luciferase. Luminescenční metodou je možné stanovit 10^5 – 10^4 mikrobiálních buněk v 1 ml mléka. Mikrobiologická kvalita vzorků mléka (počet bakteriál-

ních buněk v 1 ml) bylo také stanoveno automatickou metodou (Bacto-Scan 8000) a výsledky byly v dobré shodě s výsledky získanými bioluminescenční metodou: $y = 0.048x + 0.0007$, $r = 0.930$, $n = 32$.

mikrobiální kontaminate; mléko; adenosin-5'-trifosfát; bioluminescence; luciferasa

Contact address:

Prof. Stefano Girotti, Institute of Chemical Sciences, University of Bologna
Via S. Donato 15, 40127 Bologna, Italy

Phone: +39-51-242052, fax: +39-51-249770, e-mail: Girotti@biocfarm.unibo.it

THE COMPOSITION OF MODIFIED ATMOSPHERE DURING STORAGE OF MEAT PRODUCTS

Petr PIPEK, Jaroslav DOBIÁŠ, Vratislav SOUKUP

*Institute of Chemical Technology – Department of Food Preservation
and Meat Technology, Prague, Czech Republic*

Abstract: The changes in modified atmosphere (MA) during storage of packaged sliced sausage of Lyoner type were studied. The samples of sausage (200 g) were packaged in round thermoformed trays sealed by plastic film using MA of pure nitrogen, carbon dioxide and/or their mixtures containing 25% and 50% (v/v) CO₂. As control empty packages without meat product were used. The samples were stored for eight weeks at 4 °C. Carbon dioxide concentration in MA during storage changed in a different way depending on its initial content in the inner atmosphere. The changes were caused mainly by absorption or desorption of this gas in water and/or fat phase of sausage and by microbial (or enzymatic) production of carbon dioxide. The influence of gas diffusion through the packaging film was less important. In packages with initial carbon dioxide level of 100% and partially also with that of 50% a considerable pressure decrease occurred (so called pseudovacuum effect). The changes in the oxygen level were caused by oxidation of meat product components and by diffusion through the packaging film. In systems where pseudovacuum effect occurred levels of residual oxygen increased in small head space to the level close to its concentration in air. Nitrogen as an inert gas neither dissolved considerably in meat products nor reacted with the meat product compounds. Changes in its concentration in MA were influenced by diffusion through the plastic film and by variations of total volume of head space in packages.

meat products; modified atmosphere; shelf-life; packaging

Modified atmosphere (MA) packaging of meat and meat products has been used practically for nearly two decades. Generally it is appreciated as a suitable way of quality protection, it can extend the shelflife of this type of products up to four times comparing with the storage under air (Farber, 1990). Modified atmosphere packaging involving vacuum packaging and/or gas packaging in various mixtures of nitrogen and carbon dioxide inhibits the growth of aerobic microorganisms and slows down food deterioration caused

by oxidation. So a product packaged in modified atmosphere better keeps fresh appearance, i.e. the pink colour of meat products is more stable without grey shades, typical flavour is not influenced by rancid products, etc. In every case modified atmosphere packaging must be used properly, i.e. as one preservation treatment in combination with other antimicrobe hurdles like salt addition, adjustment of water activity, smoking, chilling storage, bacteriocin application, etc.

During slicing contamination of cut surfaces occurs and undesirable deterioration of food product is accelerated (Stiebing, 1989).

Gas packaging of meat products involves utilisation of atmosphere composed by nitrogen and carbon dioxide. Either gas prevents oxidation (Nobis, 1991). While nitrogen is inert, carbon dioxide reacts with water and decreases pH value mainly in the surface layer. In this way the preservative efficiency of modified atmosphere can be further enhanced (Brody, 1989).

Packaging materials for meat products must provide low permeability for oxygen, water vapour and aromatic substances to keep steady composition of modified atmosphere during storage. As the high gas barrier can not be obtained by utilisation one material polymer films, packaging films consisting of several plastics are widely used in practice. Laminates made of polyester (polyethylene terephthalate) or polyamide and polyethylene (LDPE) as well as copolymers of polyvinyl chloride and polyvinylidene chloride are mostly recommended for this purpose.

Generally there are enough data on permeabilities of various commercially available polymer films, so that the level of gas exchange between the environment and modified atmosphere of given composition inside package can be easily estimated. Much less is known about modified atmosphere changes during storage in consequence of its reactions with packaged food.

In our former publications we described the changes of atmosphere in vacuum packaged meat products, i.e. influence of storage conditions on increasing of carbon dioxide content and consumption of residual oxygen (Staňková et al., 1993; Pipek et al., 1993). Similar results on relation of carbon dioxide production and *Lactobacillus* growth in modified atmosphere of packaged smoked salmon were found by Civera et al. (1993).

Oxygen should be removed thoroughly from meat product packages. As it is not easy to replace the residual amounts of it, e.g. vacuum packaging as

well as gas packaging decreases the amount of oxygen in package to the level ranging from 0.1 to 1% of original amount. For the residual oxygen trapping oxygen absorbers are recommended, e.g. in the form of labels stuck on the inner surface of covered film. By this way the concentration of 0.01% of residual oxygen can be obtained.

It is obvious that the composition of modified atmosphere in packaged meat products changes during storage. The aim of present work was to study changes in CO₂ content in modified atmosphere of packaged sausages during different storage conditions with respect to dissolving of CO₂ in food product and its escape via packaging film to the environment.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Cooked finely comminuted Lyoner-type sausage was sliced and packaged in modified atmosphere of nitrogen and carbon dioxide mixtures. The samples were stored under temperature of 4 °C for eight weeks. The empty packages without meat products were prepared for comparison with the sausage containing ones.

The packages consisted of thermoformed round trays (diameter 10 cm) made of MULTIPET K 250 film (PET/PE type of packaging film, thickness 250 μm, producer Wihuri Oy Wipak, Finland) sealed by CBT 70 PEEL film (PP/PE/EVOH/PE, 250 μm, Wihuri Oy Wipak, Finland). Each package contained 150 g of meat product and 25 ml of internal atmosphere. Gas packagings in modified atmosphere of N₂ and CO₂ mixtures with four different CO₂ levels (0, 25, 50, 100%) were used.

Methods

Composition of Modified Atmosphere during storage was investigated using gas chromatography, 0.5 ml of internal atmosphere from package was directly injected into gas chromatograph. Analyses conditions were as follows:

gas chromatograph: CHROM 5 (Laboratorní přístroje Praha, Czech Republic)

TCD detector: heating current 100 A

carrier gas: argon

flow rate: 60 ml/min

temperatures: column, detector and injector 40 °C

column: length 2.5 m, inner diameter 3 mm

sorbent: PORAPACK Q (Supelco Inc., USA) for CO₂ determination

Molecular Sieve 5 A (Supelco Inc., USA) for O₂ determination

pH-value measurement

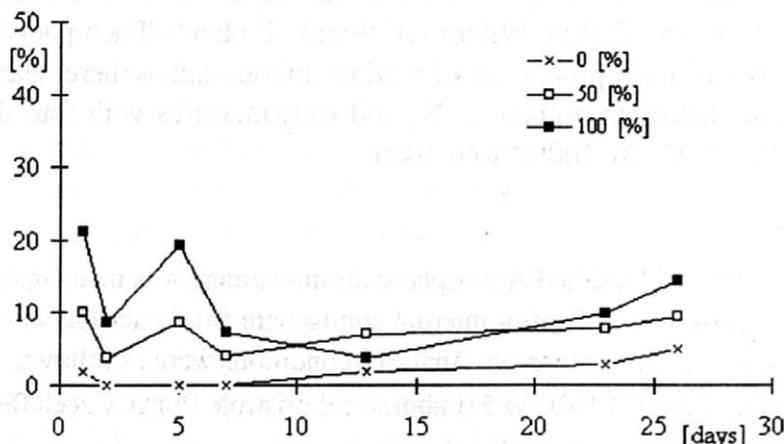
The Acidimeter 333 (Druopta Praha, Czech Republic) equipped with a combined glass-calomel electrode was used for pH value determination.

RESULTS AND DISCUSSION

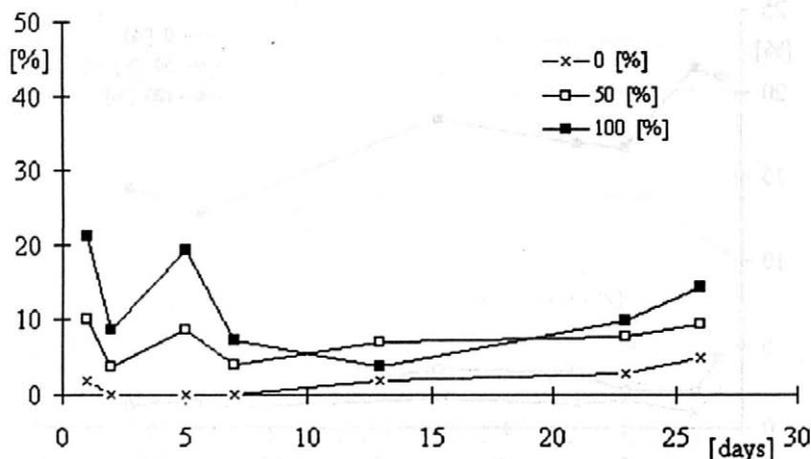
As expected the composition of MA changed during the storage of sliced sausage. These variations differed in consequence of the initial composition of MA. The most important changes were found for the oxygen and/or carbon dioxide contents.

Nitrogen levels in MA varied less significantly and rather as a function of content changes of both other gases.

Carbon dioxide levels changed in a different way in dependence on its initial content in MA. Basically three processes can influence its content. Absorption and/or desorption of this gas in water and fat phase of sausage and

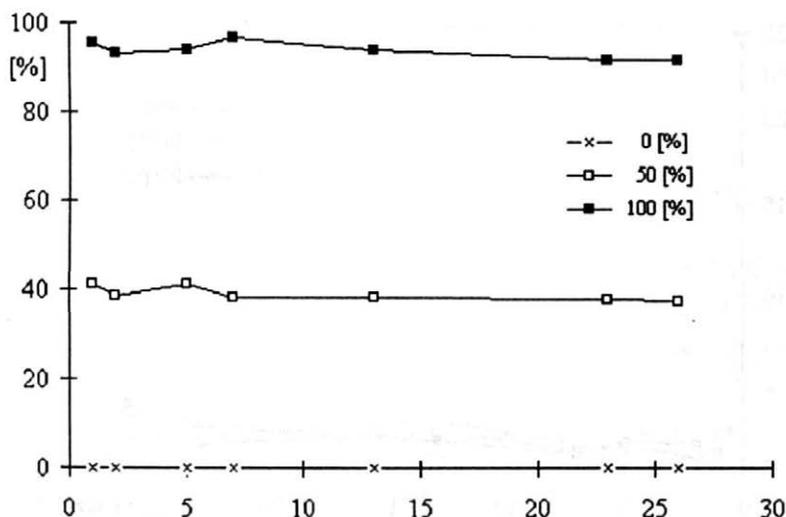


1. Carbon dioxide content during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

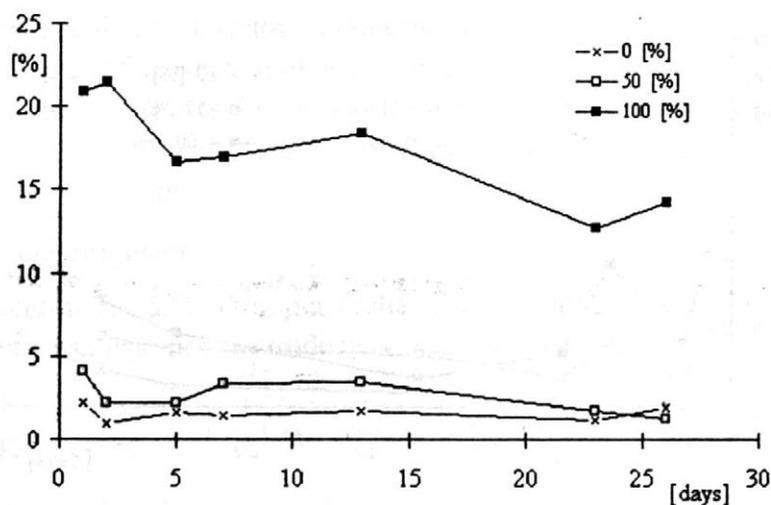


2. Carbon dioxide content during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

its microbial (or enzymatic) production were of the main importance, while the influence of gas diffusion through the packaging film was less important. The increase in carbon dioxide amount was evidently in consequence of a microflora growth, lactobacilli represented most of them.

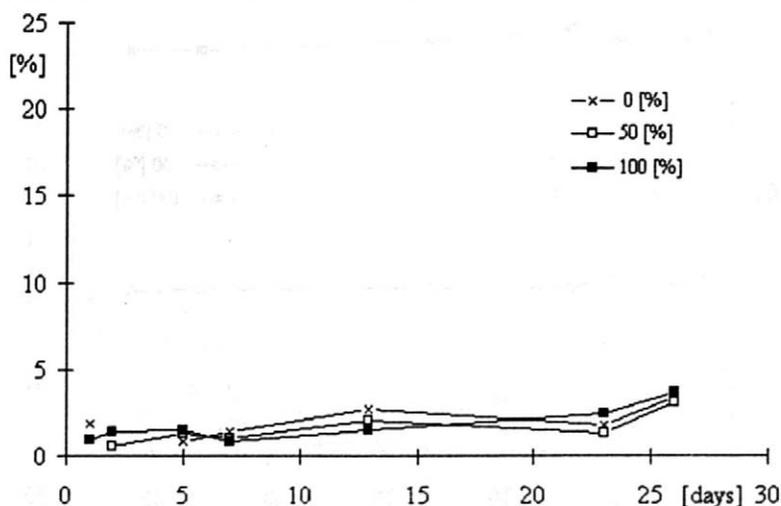


3. Carbon dioxide content in the packages without sausage under MA with different carbon dioxide content

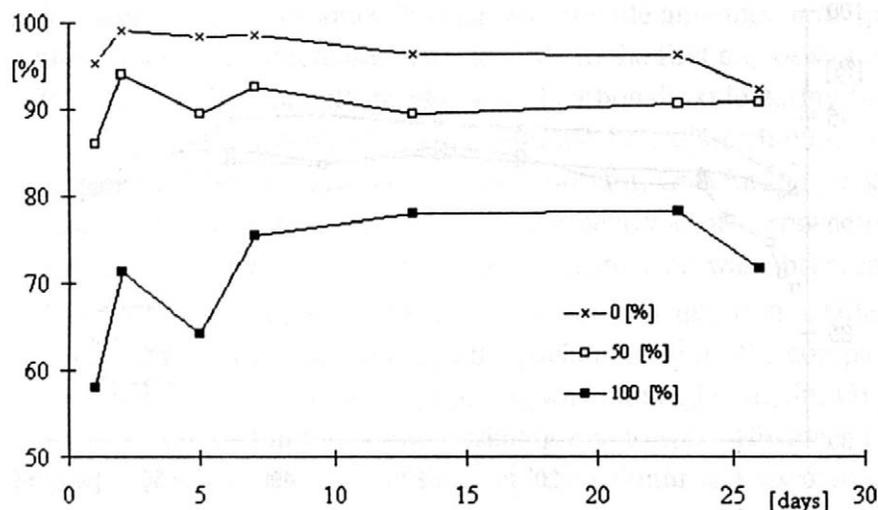


4. Oxygen content during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

The influence of various initial levels of carbon dioxide on the changes in its concentration in MA during storage is evident from Fig. 1 and 2. CO₂ content in MA originally free of carbon dioxide (i.e. 100% of nitrogen) increased rapidly during the first day of storage. In opposite the remarkable

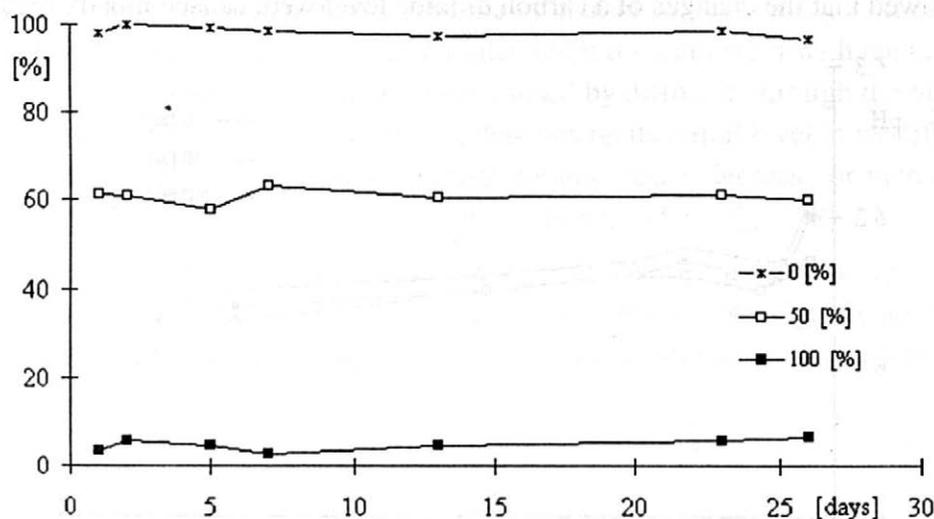


5. Oxygen content in the packages without sausage under MA with different carbon dioxide content

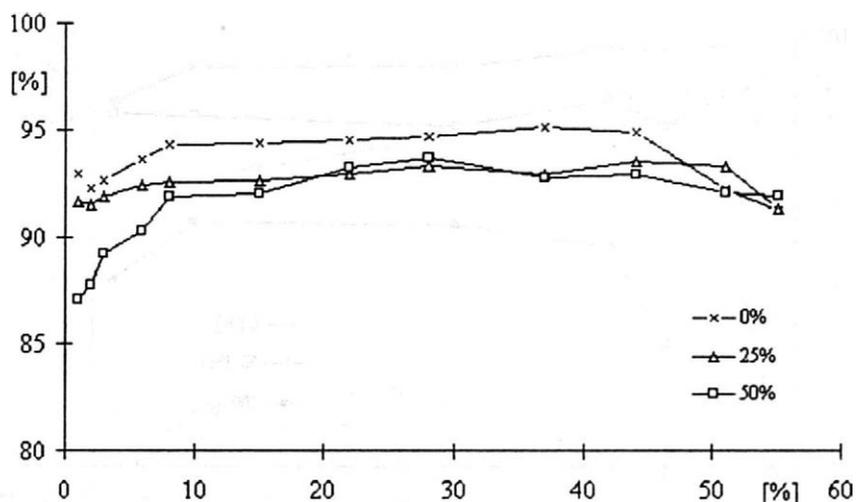


6. Nitrogen content during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

decrease of this value was observed in the packages with higher initial levels of carbon dioxide. Its absorption in the water and/or fat phase of meat products in the packages with initial carbon dioxide level 100 % and partially



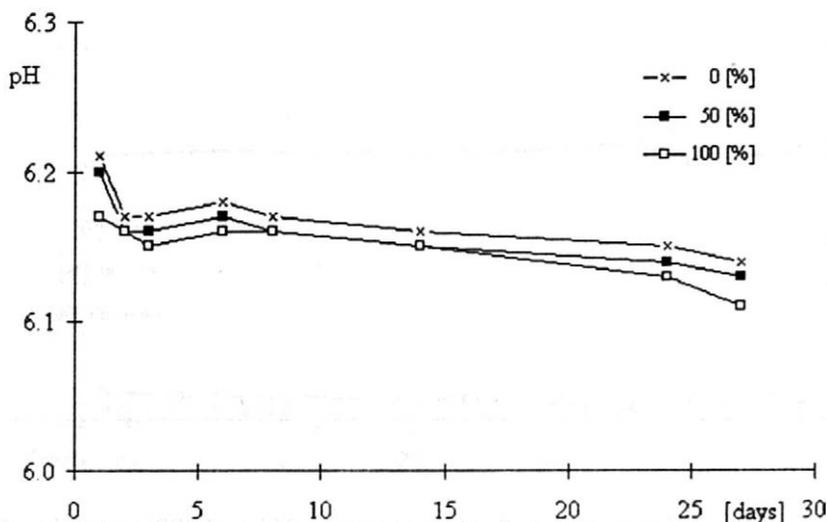
7. Nitrogen content in the packages without sausage under MA with different carbon dioxide content



8. Nitrogen content during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

also with 50 % caused the considerable pressure decrease in the packages, so they looked like vacuum packaged products (so called pseudovacuum effect).

The comparison of the packages with and without meat products (Fig. 3) showed that the changes of a carbon dioxide level were caused mostly by the



9. pH-value during storage of sausage packed under MA with different carbon dioxide content

interaction with the meat product. The carbon dioxide amounts in the packages with meat products decreased considerably in the first day of storage in the modified atmosphere and the production of carbon dioxide during further storage was observed, whereas the concentration of carbon dioxide in the packages without meat products was nearly constant. Only in the packages with initial carbon dioxide level over 50% the decrease of carbon dioxide concentration caused by diffusion through the plastic film was observed.

The changes of the oxygen level were caused by consumption (oxidation) in the material and by diffusion through the packaging film. The comparison of packages with and without meat products was interesting again. Oxygen levels slightly increased in the empty packages due to gas diffusion through the packaging film from the surroundings and the volume decrease caused by faster diffusion of carbon dioxide from the packages.

In packages with products in MA of “pure” carbon dioxide (“100%”) the absorption of CO_2 in water phase caused so considerable volume decrease that the traces of the residual oxygen concentrated in small head space to the level similar to its concentration in air (Fig. 4 and 5). An oxidation of meat products components during further storage also caused the decrease of its level.

Nitrogen represents an inert gas in the system of MA of sausages. It does not dissolve considerably in meat product and it does not react with the meat products compounds. Its changes were caused by diffusion through the plastic film (the direction of this diffusion depends on its initial level in modified atmosphere) and by changes of internal volume due to decrease or increase of other analysed gases, i.e. oxygen and carbon dioxide (Fig. 6–8).

pH-value of meat products changed mostly at the beginning of storage and its value decreased at all tested samples (see Fig.9). No significant differences were observed between the samples with different initial carbon dioxide levels.

Conclusions

Variations of carbon dioxide level are the most important changes in the modified atmosphere of meat products. They are caused mainly by the absorption in meat products. The changes in other gases, i.e. oxygen and ni-

trogen, are less apparent. The composition of modified atmosphere during storage of meat products differs considerably from the initial conditions.

References

- BÖHME, Ch. F.: The maturing and storage of meat in films. Special edition from the professional journal *Packaging Rev.*, 6, 1979: 3.
- BRODY, A. L.: *Controlled (Modified) Atmosphere Vacuum packaging of Food* 1.ed. Connecticut 1989.
- CIVERA, T. – AMERIO, G. – PARISI, E.: Conservabilità di salmone affumicato, affettato e confezionato in atmosfera modificata. *Ind. Aliment.*, 32, 1993: 705–714.
- DAY, B. P. F.: *Food Storage Symp.*, Campden, Food and Drink Res. Assoc., Velká Británie, 1990.
- FARBER, J. M. et al.: Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres. *Food Microbiol.*, 7, 1990: 327–334.
- GILL, C. O., PENNEY, N.: Consumer trials of Captech-packaged consumer cuts of meat. *Meat Ind. Res. Inst. N. Z. Rep.*, No RM183, 1989.
- GILL, C. O.: The solubility of carbon dioxide in meat. *Meat Sci.*, 22, 1988: 65–71.
- GILL, C. O.: Controlled atmosphere packaging of chilled meat. *Food Control*, 1990 April: 74–78.
- NOBIS, P.: Packing meat and meat products in protective gas. *Fleischwirtschaft*, 71, 1991, 427–428.
- PIPEK, P. – STAŇKOVÁ, L. – RŮŽEK, T.: Vnitřní atmosféra u vakuově balených výrobků. *Maso*, 4, 1993: 5–7.
- STAŇKOVÁ, L. – PIPEK, P. – RŮŽEK, T.: Changes of internal atmosphere in packaged meat products. *Potrav. Vědy*, 11, 1993: 503–508.
- STIEBING, A.: Prepackaging and canning of Kochwurst and cooked cured meat products. *Fleischwirtschaft*, 69, 1989: 1139–1144.
- STIEBING, A.: Verpackung. Anforderungen bei Fleisch und Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 72, 1992: 564–575.

Received April 4, 1997

Složení modifikované atmosféry během skladování masných výrobků

Byly sledovány změny modifikované atmosféry (MA) během skladování balených měkkých salámů (typ junior). Vzorky salámů (200 g) byly zabaleny do kulatých tepelně tvarovaných misek uzavřených plastovou fólií při použití MA z čistého dusíku, oxidu uhličitého a jejich směsi obsahujících 25 % nebo 50 % obj. oxidu

uhličitého. Jako slepý vzorek byly použity prázdné balíčky bez masných výrobků. Vzorky byly skladovány osm týdnů při 4 °C.

Koncentrace oxidu uhličitého v MA se během skladování různým způsobem změnila v závislosti na jeho počátečním obsahu ve vnitřní atmosféře. Změny byly způsobeny zejména absorpcí a desorpcí tohoto plynu ve vodě nebo v tukové fázi salámu a mikrobiální (nebo enzymovou) produkcí oxidu uhličitého. Vliv difuze plynů balicím materiálem byl méně významný. V balíčcích s počáteční koncentrací oxidu uhličitého 100 % a částečně také s 50 % nastal značný pokles tlaku (tzv. pseudovakuový efekt).

Změny hladiny kyslíku byly způsobené oxidací složek masných výrobků a difuzí přes balicí materiál. V systému, kde nastal pseudovakuový efekt došlo ke zvýšení koncentrace kyslíku v malém prostoru v balíčku, a to na koncentrace blízké koncentraci v okolním vzduchu.

Dusík jakožto inertní plyn se ani nerozpouští v masných výrobcích, ani nereaguje se složkami masných výrobků. Změny jeho koncentrace v modifikované atmosféře byly ovlivněny difuzí plastovou fólií a změnami celkového objemu plynného podílu v balíčcích.

masné výrobky; modifikovaná atmosféra; změny během skladování; balení

Contact address:

Doc. Ing. Petr Pipek, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická

Ústav konzervace potravin a technologie masa

Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika

Phone: 00 420 2 2435 3168, fax: 00 420 2 311 99 90, e-mail: petr pipek@vscht.cz

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax: 00 420 2 242 539 38

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address

Journal	Number of issues per year	Yearly subscription in USD	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	170,-	177,-
Živočišná výroba (Animal Production)	12	170,-	177,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	170,-	177,-
Lesnictví – Forestry	12	170,-	177,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	132,-	138,-
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	76,-	80,-
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	51,-	53,-
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	51,-	53,-
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	51,-	53,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	51,-	53,-

CLASSIFICATION OF LEGUMES AND LEGUME PRODUCTS*

Jana DOSTÁLOVÁ

Institute of Chemical Technology – Department of Food Chemistry and Analysis,
Prague, Czech Republic

Abstract: The new system for classification of legumes and legume products was developed. The classification was performed on the basis of chemical composition of legumes and legume products and on the basis of mode of processing as well. The advantages of this system in comparison with other systems of classification used are discussed.

legumes; pulses; legume products; classification; system; nutrition

The term “legume“, although botanically meaning the seed pod itself, is often applied both to the fruit or seed and to the plant or plant family. Pulses (pulse legumes), as distinct from oilseeds, are legumes which are planted and harvested primarily for their mature or immature seeds, a significant source of dietary protein and carbohydrates, but not primarily oil. Very often the broader term legumes is used only.

The legumes are classified to the family *Leguminosae* (syn. *Fabaceae*, *Papilionaceae*, *Viciaceae*), which belong to the third largest family among the flowering plants (after *Asteraceae* syn. *Compositae*, and *Orchideaceae*). The family *Leguminosae* has a currently estimated 16 000–19 000 species in about 750 genera (Allen, Allen, 1981). It is divided into three sub-families: *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* and *Mimosoideae*. The domesticated legumes are all members of the *Papilionoideae*, which comprises over 300 genera with over 10 000 species. Almost 60 domesticated grain legume species are ordinarily used for food purposes. Of these species only a minor part is so widely grown as to constitute the bulk of the legumes grown and consumed world-wide (Table I).

* The project within the frame of the programme CIPA-CT92-4020 (LINE Network).

The human food the legumes supply is of three kinds:

- edible tubers
- leaves, green pods and unripe seeds (vegetable legumes)
- ripe dry seeds (grain legumes, pulses)

I. List of main legumes grown and consumed world-wide

Botanical name*	Common name*
<i>Arachis hypogaea</i> L.	peanut, groundnut
<i>Cajanus cajan</i> (L.) MILLSP. <i>Cajanus indicus</i> SPRENG	pigeon pea, red gram
<i>Cicer arietinum</i> L.	chick-pea, gram, bengal gram
<i>Glycine hispida</i> MAXIM <i>Glycine max</i> (L.) MERRILL <i>Glycine soja</i> SIEB. et ZUCC. <i>Soja hispida</i> MOENCH <i>Soja max</i> L.	soybean, soya bean, soja
<i>Lathyrus sativus</i> L.	grass pea, vetchling, chickling pea
<i>Lens esculenta</i> MOENCH <i>Lens culinaris</i> MEDIK <i>Ervum vulgare</i> HUTH	lentil
<i>Phaseolus limensis</i> L.	baby lima bean
<i>Phaseolus lunatus</i> L.	large lima bean
<i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Phaseolus esculentus</i> SALISB	ripe seed: common bean, kidney bean, dry bean, pinto bean young pod: green bean, french bean, wax bean
<i>Pisum sativum</i> L.	green pea, garden pea, field pea
<i>Vicia faba</i> L. <i>Faba vulgaris</i> MOENCH	broad bean, fava (faba) bean, horse bean, windsor bean
<i>Vigna glabra</i> SAVI	cowpea
<i>Vigna sinensis</i> ENDL.	cowpea, black-eyed pea
<i>Vigna mungo</i> L. HEPPER <i>Vigna unguiculata</i> L. WALP <i>Phaseolus mungo</i> L. HEPPER	black gram
<i>Vigna radiata</i> (L.) WILCZEK <i>Phaseolus aureus</i> L. <i>Phaseolus radiatus</i> L.	green gram, mung bean, golden gram

*It is possible to find further names, esp. common names in the literature

The main legumes consumed also as vegetable are summarised in Table II.

II. Important legumes used as vegetable

Botanical name*	Common name*
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L. TAUB	guar
<i>Glycine soja</i> SIEB. et ZUCC.	soybean
<i>Phaseolus limensis</i> L.	lima bean
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	string bean
<i>Pisum sativum</i> L.	garden pea

* It is possible to find further names, esp. common names in the literature

Seeds of leguminous plants (grain legumes) are important feed ingredients for livestock but only a small fraction of species are used for animal feeding at present (Table III). For some legumes, such as soybeans or peanuts, animal feeds represent a major consumer for the seed. For other legumes, such as beans of the *Phaseolus* species, animals are considered secondary users of cull or off-grade seeds.

III. List of important grain legumes used as feed ingredients for livestock

Botanical name*	Common name*
<i>Arachis hypogaea</i> L.	peanut
<i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L. TAUB	guar
<i>Glycine soja</i> SIEB. et ZUCC.	soybean
<i>Lupinus albus</i> L.	white lupine
<i>Lupinus angustifolius</i> L.	blue lupine
<i>Lupinus luteus</i> L.	yellow lupine
<i>Pisum sativum</i> L.	field pea
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i> (L.) DC.	winged bean
<i>Vicia faba</i> L.	faba bean

* It is possible to find further names, esp. common names in the literature

The legumes are the second most important agricultural plant commodity, after grasses (*Poaceae* syn. *Gramineae*), in animal nutrition and in human nutrition in developing countries as well. The consumption of legumes in developed industrial countries is of minor importance but would be desirable to increase it due to their high nutritional value and health-promoting effects. Legume seeds are on the average twice as rich in protein as grains and the nutritional value of legume proteins is higher. The consumption of legume proteins is not connected, in most cases, with the consumption of high quantities of fats. It is a very positive fact, because the consumption of fats in developed industrial countries is too high, and it is one of the reasons of high prevalence of cancer, cardiovascular and many other diseases. The legume seeds are well stocked in the B vitamins and some minerals. The fibre is a very valuable part of legumes as well. Some legumes are eaten green in the pod, when they contain fairly high quantities of provitamins A and vitamin C. The soybeans and peanuts are sources of high quality oils. The composition of raw and cooked legumes was excellently summarised by Matthews (1989).

The consumption of legumes in Central Europe has been continually decreasing during the last 100 years. The legume consumption in the Czech Republic is very low at present, a little above 1 kg per capita per year (Statistical Year Book of the Czech Republic, 1996), and it is similar to other developed countries, with the exception of southern countries of Europe, USA and Canada (3–6 kg per capita per year) (Food Consumption Statistics, OECD Paris, 1991). High consumption of legumes is in Japan as well, due to high consumption of soybeans and soybean products (Erdman, Fordyce, 1989). The consumption of vegetable legumes is negligible in the Czech Republic (below 0.5 kg per capita per year) (Statistics of Household Budget Surveys, 1995). The consumption of legumes in the developing countries of Africa, Asia and Latin America is much higher and is associated with poverty, although it is accepted in India, where religion or local customs prevent consumption of meat or dairy products. In Latin America, legumes constitute about 10% of the diet, in different regions of India the proportion is in the range 30–50% (Salunkhe, Desphande, 1991).

There is a little increasing trend in the legume consumption, especially soybeans, in the developed countries due to the moderately increasing number of

vegetarians, nutritional knowledge and new products from legumes on the food market.

Ripe dry legume seeds could not be consumed as a food raw due to their unsuitable sensory quality (unpleasant beany flavour and hard texture) and presence of various antinutritional factors. Some of them are heat labile and can be destroyed by various types of cooking. Most of antinutritional factors can be destroyed by fermentation or sprouting as well. The processing of legumes is of crucial importance for the type of legume product.

The most important cooking method suitable for legumes in households is boiling in water or steam under atmospheric or higher pressure. Less frequent methods are stewing or baking. Cooked legumes can be a part of various fried dishes. Roasted legumes serve as snacks.

The industrial methods of legume processing are more diversified. In addition to traditional method of processing – milling, cooking (boiling and steaming), canning, freezing, roasting and parching, germination or sprouting and fermentation, several modern methods exist – puffing, extrusion, expansion, texturisation. Soybeans and peanuts are processed to refined oils. Soybeans offer many further possibilities of technological processing – production of soy protein, soymilk or soy curd (tofu), various fermented products, etc.

The number of legume products on the food market is very high, and their composition very varied. Main types are as follows: products on whole seeds, fat or protein basis and products with whole seeds as ingredients.

The legumes represent a very different group of foods from the point of view of chemical composition, possibilities of technological processing and importance in human nutrition, and therefore, detailed classification is needed. The detailed classification of legumes and legume products was not done in the whole extent up to present. The botanical classification is not sufficient because there are legumes with various nutritional and technological properties in one tribe. E.g. the tribe *Phaseoleae* comprises the genus *Glycine* and *Phaseolus*, whose properties are very different. The detailed classification system of legumes will be useful most of all in nutritional evaluation of consumed foods. It would be useful in various statistical and trade balances and in food commodity science as well.

METHODS OF CLASSIFICATION

Food products represent a very large and varied group of products in the developed industrial countries. The classification, coding and description is necessary for good orientation and work with this group.

Systems of food classification in the Czech Republic are gradually changing at present. The Soviet systems and Czech historical systems were used until quite recently. These systems have been gradually substituted by systems of the European Union now.

Several different systems of food classification of more importance and greater number of further systems of minor importance are used in the Czech Republic at present (Table IV) (Dostálová, 1997).

IV. The main systems of food classification used in the Czech Republic

1.	System of Standard Classification of Product
2.	The classification system of Customs Tariff
3.	The classification of foods in the Czech Food Codex
4.	Classification system used in Food Composition Tables
5.	System used in statistics of Household Budget Surveys

The Standard Classification of Product and the classification system of Customs Tariff are harmonised with international standards. Standard Classification of Product is based on European standard CPA (Classification of Product by Activities) and Customs Tariff applies complex nomenclature of the customs tariff of European Union.

The classification system of Czech Food Composition Tables is different from the system of tables of other European countries and system of Household Budget Surveys as well. It is planned to accept the PROCOME (COI-COP-HBS) Food Coding System (PROCOME, 1996) classification for the Household Budget Surveys in the near future.

The legume and legume products are included in several classes of food classification system (systems 1, 2) or included in one class without further detailed classification (systems 3–5). For nutritional evaluation of food, detailed classification of legumes or legume products is needed. This classification of legume seeds has to be made on the basis of their chemical

composition and the classification of legume products on the basis of processing as well. These aspects were taken into account in the proposed classification system. Main groups are classified according to chemical composition and subgroups are classified according to processing. The classification according to chemical composition was introduced for the following reasons.

1. The chemical composition and possibilities of usage differ very much between vegetable legumes and grain legumes. Grain legumes have lower water content, higher content of proteins and saccharides and lower content of vitamin C, and oilseeds higher fat content than vegetable legumes. The vegetable legumes are therefore classified into the group of vegetables in most classification systems. It is necessary, however, to differ between them, because the chemical composition of vegetables and vegetable legumes differs very much as well. Vegetable legumes have lower water content, higher content of proteins (about 8%) and saccharides (about 20%) than other kinds of vegetables.

2. The chemical composition of legumes within the group of grain legumes is very different as well. It is necessary to differentiate between low fat legumes (pulses) and high fat legumes (oilseeds). The fat content of pulses is in the range of 1–1.5% and the fat content of oilseeds between 20–50 % (average 20% in soybeans and average 50% in peanuts).

3. Because of limited possibilities of breeding the genetic engineering technology will be applied to improve the chemical composition of legumes in the near future. The genetic manipulations are focused most of all to increase nutritional value of proteins (e.g. increasing S-aminoacids content) and to decrease content of flatulent saccharides. Genetically modified legumes due to their different nutritional value have to be classified as a special group.

On the basis these facts the new classification system of legumes and legume products for human nutrition was developed by the author (Table V and VI).

V. The proposed classification system of legumes for human nutrition

1 Vegetable legumes	2 Grain legumes*
1.1 Green pods	2.1 Pulses (low fat)**
1.2 Fresh ripe seeds	2.2 Oilseeds (high fat)
1.3 Fresh unripe seeds	3 Genetically modified legumes

*The name grain legumes is used by some authors only for pulses

**The name pulses is sometimes used for oilseeds (most of all soybeans) as well

VI. Proposed classification system of legume products

1 Products from vegetable legumes 1.1 Canned or frozen pods or seeds 1.2 Industrial or home made meals	1.3 Products with vegetable legumes as ingredients* 1.3.1 Canned or frozen vegetable mixtures 1.3.2 Industrial or home made meals
2 Products from pulses 2.1 Products on whole seeds basis 2.1.1 Canned beans 2.1.2 Roasted beans 2.1.3 Puffed beans 2.1.4 Sprouted beans 2.1.5 Fermented products 2.1.6 Others 2.2 Products on protein basis 2.2.1 Protein flours 2.2.2 Protein concentrates	2.2.3 Extruded or expanded protein products 2.3 Products with pulse as ingredients* 2.3.1 Canned or frozen 2.3.2 Fermented products 2.3.3 Industrial or home made meals 2.3.4 Others 2.4 Products with pulse products as ingredients* 2.4.1 Bakery and confectionery products 2.4.2 Industrial or home made meals 2.4.3 Others
3 Products from oilseeds 3.1 Products on whole seeds basis 3.1.1 Canned beans 3.1.2 Roasted beans 3.1.3 Puffed beans 3.1.4 Sprouted seeds 3.1.5 Plant milks** 3.1.6 Oriental legume products 3.1.6.1 Non-fermented 3.1.6.2 Fermented 3.1.7 Peanut butter 3.1.8 Others 3.2 Products on protein basis 3.2.1 Flours 3.2.1.1 Full-fat 3.2.1.2 High-fat 3.2.1.3 Low-fat 3.2.1.4 Defatted (extracted meals) 3.2.1.5 Grits	3.2.1.6 Lecithinated 3.2.2 Protein concentrates 3.2.3 Protein isolates 3.2.4 Textured protein product 3.3 Products on fat basis 3.3.1 Refined oils 3.3.2 Soy lecithin 3.4 Products with whole seeds as ingredients* 3.4.1 Canned or frozen products 3.4.2 Confectionery products 3.4.3 Industrial or home made meals 3.4.4 Others 3.5 Products with legume products as ingredients* 3.5.1 Meat products 3.5.2 Dairy products 3.5.3 Bakery and confectionery products 3.5.4 Industrial or home made meals 3.5.5 Others
4 Products from genetically modified legumes	

*Can be separated into two groups: 1. with legumes or legume products prevailing;
2. with legumes or legume products as minor ingredients

** The term "milk" should not be used, because milk is the product of the mamma only

A similar system could be proposed for feedstuffs on the legumes and legume products basis.

The proposed system of classification of legumes and legume products was developed most of all for the purposes of nutritional evaluation of foods and therefore legumes with similar chemical composition were grouped into classes. This system will be useful for food commodity science and statistics as well, because the products with the same way of processing, character and consumer value are listed in one subgroup. Some modifications will be needed for customs purposes.

The aspects of packaging were not taken in account but it is very easy to include them in the system. Some products can be classified, of course, in two or more different groups, e.g. tofu (soy curd) may be classified into the group of non-fermented oriental products or in the group of products on the protein basis.

This system of classification has the advantage in comparison with other systems used in the Czech Republic in the fact, that all legumes are classified into one group. The great number of subgroups and easy way to extend them are other advantages of the system.

The proposed system has the above described advantages also in comparison with PROCOME (Eurostat version), the new COICOP-HBS (1996), where legumes are classified into group vegetables (subgroup vegetables grown for their fruit, and subgroup dried vegetables, both without further differentiation) and soy products into group salt, spices, sauces, and food products n.e.c.

Conclusions

Legumes and legume products represent a very large and varied group of foods and therefore the special system of classification is needed. The new detailed classification system of legumes and legume products was developed. This system is advantageous, most of all, from the point of view of evaluation of the nutritional value of food consumed.

References

ALLEN, O. N. – ALLEN, E. K.: *The Leguminosae*. Madison, Univ. Wisconsin Press 1981.

ERDMAN, J. W., Jr. – FORDYCE, E. J.: Soy products and the human diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 1989: 725–736.

DOSTÁLOVÁ, J.: Classification of foods in the Czech Republic. *Potrav. Vědy*, 15, 1997: 69–79.

MATTHEWS, R. H. (Ed.): Legumes: Chemistry, Technology, and Human Nutrition. New York, Marcel Dekker Inc. 1989.

SALUNKHE, D. K. – DESPHANDE, S. S.: Foods of Plant Origin. New York, AVI 1991.

Food Consumption Statistics. Paris, OECD 1991.

PROCOME (COICOP-HBS). Food Coding System. Brussels, DAFNE 1966.

Statistická ročenka České republiky. Praha, Český statistický úřad 1996.

Statistika rodinných účtů. Praha, Český statistický úřad 1995.

Received February 7, 1997

Klasifikace luštěnin a výrobků z luštěnin

Plody rostlin čeledi *Fabaceae* (bobovité) a výrobky z nich představují velkou a velice různorodou skupinu, a proto je nelze z hlediska významu a způsobů využití v lidské výživě zařadit do jedné skupiny potravin. Zařazení do více potravinových skupin má také určité nevýhody, především při vyhodnocování výživové situace obyvatelstva z hlediska příjmu jednotlivých živin. V Ústavu chemie a analýzy potravin VŠCHT byl proto vypracován nový podrobný systém třídění zohledňující chemické složení plodů (především obsah tuku a bílkovin) a u výrobků i způsob technologického zpracování. Výhody a nevýhody proti stávajícím systémům třídění jsou diskutovány.

luštěniny; výrobky z luštěnin; třídění; výživa

Contact address:

Ing. Jana Dostálová, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická
Ústav chemie a analýzy potravin, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika
Phone: 00 420 2 2435 3264, fax: 00 420 2 311 99 90, e-mail: fpbt-office vscht.cz

MUTAGENNÍ AKTIVITY NĚKTERÝCH LÁTEK ROSTLINNÉHO PŮVODU*

Mutagenic Activity of Substances of Plant Origin

Bohumil TUREK, Ivan BÁRTA¹, Petr ŠMERÁK¹, Eliška KOVÁČOVÁ,
Markéta SEDMÍKOVÁ¹, Helena ŠESTÁKOVÁ

State Institute of Public Health, Prague; ¹3rd Medical School, Charles University,
Prague, Czech Republic

Abstract: Mutagenic activities of substances of plant origin (extract *Angelicae archangelica* – α -angelicalactone, juglone, extract *Humuli lupuli* – emodine, hype-ricine, and psoralene) were tested with the aid of the Ames test in the prokaryotic model and low doses (approximating 0,1 LD₅₀) and the micronucleus test on the eukaryotic model. In question are substances in which there have been demonstrated mutagenic activities and at the same time this effect was not confirmed by others or there have also been found antimutagenic effects, In the Ames test the mutagenic effect has been found only in juglone and α -angelicalactone. In the micronucleus test a statistically significant higher frequency of micronuclei in comparison with controls has been found in all substances except angelicalactone namely in at least one of the concentration tested. The resulting effect of tinctures and extracts may differ according to the proportion of certain substances influencing genotoxicity which pass into these solutions. The results of the follow-up of these natural substances show that in many plants used as vegetables, spices, or medicinal herbs, it is possible to anticipate the presence of substances showing mutagenic activity in conditions *in vivo* and *in vitro*.

mutagenic activity; substances of plant origin; Ames test; micronucleus test

Abstrakt: Mutagenní aktivity látek rostlinného původu (extrakt *angelicae archangelica*, resp. α -angelikalakton, juglon, humulon, emodin, hypericin a psoralen) byly testovány Amesovým testem na prokaryotním modelu a v nízkých dávkách (blízkých 0,1 hodnoty LD₅₀) mikronukleus testem na eukaryotním modelu. Jedná se o látky, u nichž byla dříve prokázána mutagenní aktivita, ale v jiných pracích nebyl tento efekt potvrzen nebo byly prokázány též účinky antimutagenní. V Amesově testu byl nalezen mutagenní efekt pouze u juglonu

* Tato práce byla provedena v rámci úkolu GAČR 311/94/1739.

antimutagenní. V Amesově testu byl nalezen mutagenní efekt pouze u juglonu a α -angelikalaktonu. V mikronukleus testu indukovaly statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern ve srovnání s kontrolní skupinou všechny testované látky kromě angelicinu, a to alespoň v jedné ze sledovaných koncentrací. Výsledný efekt tinktur a extraktů může být rozdílný podle podílu některých látek ovlivňujících genotoxicitu, které přecházejí do roztoků. Výsledky sledování přírodních látek prokazují, že je možné v řadě druhů rostlin požívaných jako zelenina, koření nebo jako léčivé byliny předpokládat výskyt látek vykazujících mutagenní aktivitu za podmínek *in vivo* i *in vitro*.

mutagenní aktivita; látky rostlinného původu; Amesův test; mikronukleus test

Expozice populace karcinogenním látkám představuje významný vliv prostředí na incidenci nádorových onemocnění. Kromě chemických karcinogenních látek existuje velká skupina přirozených látek vykazujících genotoxické účinky. Jedná se o látky přirozeně se vyskytující v potravinách zejména rostlinného původu nebo o látky vytvářené v rostlinné tkáni jako reakce na působení různých stresových podnětů (fytoalexiny). V hodnocení zdravotní nezávadnosti rostlinných produktů převažovalo sledování akutní toxicity. Průkazy mutagenní aktivity u řady látek přirozeně se vyskytujících v rostlinách, např. i v léčivých bylinách, vedly ke zvýšení zájmu o jejich sledování i z hlediska jejich genotoxického rizika.

K poznání mutagenní aktivity u řady látek rostlinného původu přispěly značnou měrou původní práce (Ames, 1983, 1990; Ames, Gold, 1991; Bjeldanes, Chang, 1977) a práce poukazující na karcinogenní účinky (Weisburger, 1979) přirozeně se vyskytujících látek v různých rostlinách. U některých chemicky definovaných látek byla jejich genotoxicita bezpečně prokázána a řada produktů z rostlin, které tyto látky obsahují, jsou podezřelé ze zvyšování genotoxického rizika.

Z uvedených přirozeně se vyskytujících látek rostlinného původu jsme se zaměřili na ověření mutagenní aktivity látek, u nichž byla prokázána mutagenní aktivita, ale zároveň v jiných pracích tento efekt nebyl potvrzen nebo byly prokázány též účinky antimutagenní. Jedná se o tyto látky: angelicin, resp. α -angelikalakton, juglon, humulon, emodin, hypericin a psoralen. Studované sloučeniny byly vybrány nezávisle na struktuře a výskytu. Hlavním kritériem byl biologický účinek, který se jevil v různých studiích rozdílný. V řadě případů se ukazuje rozdíl v působení aktivních látek v rostlinách a extraktů z celých rostlin nebo jejich částí, proto jsme se zaměřili nejen na autentické sloučeniny, ale i na extrakty drog.

Juglon – derivát naftochinonu (5-hydroxy-1,4-naftochinon), působí cytotoxicky na hepatocyty a indukuje volné kyslíkové radikály aktivací kyslíku (O'Brien,

traktů z celých rostlin nebo jejich částí, proto jsme se zaměřili nejen na autentické sloučeniny, ale i na extrakty drog.

Juglon – derivát naftochinonu (5-hydroxy-1,4-naftochinon), působí cytotoxicky na hepatocyty a indukuje volné kyslíkové radikály aktivací kyslíku (O'Brien, 1991). Juglon je obsažen v rostlinách čeledi Juglandaceae, zejména v ořešáku královském, *Juglans regia*.

Emodin vykazuje mutagenní aktivitu v Amesově testu s TA1537 s metabolickou aktivací i bez ní (Krivobok et al., 1992). Genotoxickou a cytotoxickou aktivitu bez metabolické aktivace vykazuje též extrakt z houby kožnatky krvavé, *Dermocybe sanguinea*, obsahující emodin (Wright et al., 1992). Anthrachinon emodin se jako glykosid vyskytuje také v reveni. Emodin inhibuje tyrozinasu, což je podstatou jeho podpory antikarcinogenního působení jiných látek, jak prokázali Zhang a Hung (1996). Snižuje také aktivitu protein kinasy C (Fredenhagen et al., 1995).

Hypericin má význačný fotosenzibilizační efekt. Je obsažen zejména v třezalce tečkované, *Hypericum perforatum*. Má antivirové účinky (Harris et al., 1996; Cohen et al., 1996), inhibuje protein kinasu C (Agostinis et al., 1996) a má antiproliferační účinky. Při sledování antikarcinogenního efektu hypericinu a jeho subcelulární distribuce byl prokázán především v membránách a jádrech nádorových buněk (Miskovsky et al., 1996).

Angelicin je furanokumarin obsažený v andělice (*Archangelica officinalis*) a v pastináku (*Pastinaca sativa*). Andělíky se často používá jako léčivé byliny. Extrakt kořene andělíky vykazuje slabé mutagenní účinky *in vitro* při použití Amesova testu s TA98 a TA100 s metabolickou aktivací S9 frakcí i bez ní (Göggelmann, Schimmer, 1986).

Angelikalakton α -, stejně jako β -isomer s dvojnou vazbou v konjugaci s karbonylovou skupinou, jsou reaktivnější než angelicin a mají výraznější účinky.

Psoralen patří mezi významné lineární furanokumariny. Je řazen mezi fytoalexiny, což jsou látky vytvářené v tkáních rostlin jako součást ochranných mechanismů proti nepříznivým vlivům (stresové reakce). Má genotoxické účinky (Smith, 1982). Psoralen je obsažen zejména v celeru (*Apium graveolens*), pakmínu (*Ammi majus*), pastináku (*Pastinacea sativa*) a petrželi (*Petroselinum sativum*). Pro zvýšení produkce psoralenu a jeho derivátů je významné napadení rostliny fytopatogenními mikroskopickými houbami

(*Phytophthora infestans*, *Sclerotia sclerotiorum*), které mohou vyvolat při látkové přeměně v bulvě celeru reakce vedoucí k mnohonásobně (10 až 100krát) vyšší produkci psoralenu (Scheel et al., 1963, Wu et al., 1972). Jeden z derivátů psoralenu, 8-metoxypsoralen + PUVA (psoralen + dlouhovlnné UV spektrum) je v klasifikaci karcinogenních látek podle IARC řazen do skupiny 1 a podle ARC do skupiny prokázaných karcinogenů (Fung et al., 1995). Karcinogenita psoralenu je potencována působením dlouhovlnného UV spektra (UVA). UV spektrem je rovněž zjišťováno poškození DNA a tvorba adduktů s nukleovými kyselinami (Hannuksela et al., 1986).

Humulon a lupulon jsou důležitými látkami obsaženými v šišticích chmele (*Humulus lupulus*). Jedná se o α - a β -hořké kyseliny, které mají účinky sedativní, a je u nich pozorován též antibakteriální efekt. Göggelmann a Schimmer (1986) prokázal u chmelového extraktu *in vitro* slabý mutagenní účinek u kmenů TA98 a TA100 *Salmonella typhimurium* s metabolickou aktivací i bez ní.

MATERIÁL A METODY

Amesův test

Principem Amesova testu na prokaryotním modelu (Maron, Ames, 1983; Černá et al., 1989) je sledování spontánních a indukovaných reverzních mutací u speciálních kmenů bakterií (auxotrofních kmenů his bakterie *Salmonella typhimurium*, kmeny TA98 a TA100). Pro modelování metabolické přeměny *in vitro* byla použita S9 frakce jaterního homogenátu z jater potkanů indukovaná směsí polychlorovaných bifenylyů Aroclorem 1254.

Jako pozitivní kontrola byly používány látky se známými a ověřenými mutagenními vlastnostmi (referenční mutageny): 2-aminofluoren v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{misku}$, v případě TA98 i TA100 jako nepřímý mutagen. Jako přímý mutagen byl použit 4-nitro-1,2-fenylendiamin (NOFD) pro TA98 v koncentraci 30 $\mu\text{g}/\text{misku}$ a azid sodný v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{misku}$ pro TA100. Aminofluoren a NOFD byly ředěny koncentrovaným dimethylsuloxidem (DMSO), azid sodný byl rozpouštěn v destilované vodě. Většina látek rostlinného původu a referenční mutageny byly rozpouštěny v DMSO a základní roztok byl dále DMSO naředěn na požadované koncentrace. U látek nerozpustných v DMSO (juglon, hypericin) byl jako rozpouštědlo použit aceton.

Koncentrace byly řaděny tak, aby odpovídající množství testované látky bylo rozpuštěno v 0,1 ml rozpouštědla.

U α -angelikalaktonu a extraktu z kořene *Archangelica officinalis* byly testovány koncentrace 50, 10 a 5 μg na 1 miskku. Juglon byl testován v dávkách 1, 0,5, 0,1 a 0,05 μg na 1 miskku. U extraktu z květenství *Humulus lupulus*, emodinu a hypericinu byly zvoleny dávky 50, 10 a 5 μg /misku. Psoralen byl testován v dávkách 100, 10, 1, 0,1 a 0,01 μg na 1 miskku.

Po uplynutí kultivační doby byly odečteny počty revertant na přístroji Bio-tran III, Edison N. J. USA. Každá jednotlivá koncentrace sledovaných látek či jejich směsí byla testována v každém pokuse na třech miskách a každý pokus byl minimálně dvakrát opakován.

V každém pokusu byl sledován počet spontánních revertant u každého kmene za přítomnosti 0,1 ml příslušného rozpouštědla na miskku (negativní kontrola – NK). Poměr mezi průměrným počtem spontánních revertant a průměrným počtem indukovaných revertant u testovaných koncentrací (koeficient K) byl použit jako základní kritérium pro hodnocení mutagenní aktivity testované látky. Statistické hodnocení mutagenity bylo provedeno stanovením intervalů spolehlivosti na základě Poissonovského rozdělení na 5% hladině významnosti. Statisticky významné rozdíly revertant zjištěné u jednotlivých koncentrací testovaných látek proti kontrole (NK) a rozdíly mezi oběma kmeny byly hodnoceny t -testem.

Mikronukleus test

Mikronukleus test (Schmid, 1975; Gregor et al., 1987; DECD, 1983) hodnotí mutagenní (klastogenní) aktivitu testovaných chemických látek na eukaryotním savčím modelu *in vivo* (schopnost indukovat zlomy chromozomů).

Na základě požadavku získat údaje o mutagenní aktivitě nízkých dávek testovaných látek rostlinného původu jsme při mikronukleus testu vycházeli z 0,1 hodnoty LD_{50} , která byla použita jako výchozí koncentrace. Testované látky rostlinného původu (s výjimkou psoralenu) byly podávány jednorázově sondou do trávicího traktu myši. Ve všech pokusech byla příslušná látka podávána v objemovém množství 0,2 ml na 10 g tělesné hmotnosti myši. V pokusech, v nichž byl podáván s testovanou látkou olivový olej, příp. jiné rozpouštědlo, bylo aplikováno stejné množství olivového oleje, resp. rozpouštědla i kontrolní skupině.

Byly použity bílé laboratorní myši SPF, kmene ICR od fy. Top-Velaz, o tělesné hmotnosti 20–25 g, kterým byly aplikovány testované látky v různých koncentracích.

Přehled použitých koncentrací testovaných látek (g/kg tělesné hmotnosti), doby jejich působení (h) a odpovídající zlomek hodnoty LD₅₀:

látka	doba expozice	koncentrace	hodnoty LD ₅₀
α -angelikalakton	24, 48, 72	0,14; 0,28; 1,4; 2,1; 2,8	0,05, 0,1, 0,5, 0,75, 1*
Extrakt z kořene			
<i>Archangelica officinalis</i>	48, 72	0,22; 1,1; 1,6	0,1, 0,5, 0,75**
Juglon	24, 48, 72	0,08; 0,04; 0,02	
Extrakt z květenství			
<i>Humulus lupulus</i>	24, 48, 72	0,185; 0,092; 0,018	
Emodin	48, 72	0,015; 0,007; 0,0038	0,2, 0,1 a 0,05***
Hypericin	48, 72	0,008; 0,004; 0,002	
Psoralen	24	0,02; 0,04; 0,08	

*Drug and Chemical Toxicology (1980) (Micromedex)

**Food and Cosmetics extract Toxicology (1975) (Micromedex)

***Bachmann et al. (1979)

α -angelikalakton byl pokusným zvířatům podáván v olivovém oleji. Zásobní roztok extrakt z kořene *Archangelica officinalis* v propylenglykolu byl ředěn na testovaná množství olivovým olejem. Juglon a hypericin byly rozpuštěny v malém objemu acetonu a za stálého míchání při teplotě 35 °C byl přidán příslušný objem olivového oleje. Po odpaření acetonu byla koncentrace obou látek upravena na hodnoty uvedené v přehledu a látky podávány pokusným zvířatům. Zásobní roztok extraktu z květenství *Humulus lupulus* ve 40% etanolu byl dále ředěn destilovanou vodou na požadovanou testovanou koncentrací. Emodin byl pokusným zvířatům podáván v olivovém oleji. Psoralen byl rozpuštěn v 7% DMSO. Koncentrace byly ředěny tak, aby množství testovaného mykotoxinu, vztaženo na 10 g tělesné hmotnosti myši, bylo rozpuštěno v 0,1 ml rozpouštědla (7% DMSO). Pokusným zvířatům byl psoralen aplikován intraperitoneálně v jednorázových dávkách.

Po zpracování kostní dřevě bylo při zvětšení 1 000krát pod imerzí hodnoceno u každého zvířete 1 000 polychromatofilních erythrocytů (PCHE) a fre-

kvence mikrojadern. U každé experimentální skupiny zvířat byl vyjadřován průměrný počet mikrojadern vztažených na 1 000 PCHE.

Jako pozitivní kontrola byly použity myši ovlivněné i. p. cyklofosfamidem (referenční mutagen) v dávce 20 a 40 mg/kg. Negativní kontrolou byly myši ovlivněné *per os* příslušným rozpouštědlem, u nichž nebyla zjištěna signifikantně vyšší četnost mikrojadern ve srovnání s intaktními zvířaty. Porovnáním frekvencí mikrojadern po podání testované látky a kontrolních látek byl získán základní údaj o mutagenní aktivitě testovaného vzorku. Statistické hodnocení výsledků mikronukleus testu bylo prováděno *t*-testem na 5% hladině významnosti. V tabulkách je statisticky významně vyšší frekvence počtu mikrojadern označena ve sloupci mutagenita výrazem – (nemutagenní), příp. + (mutagenní).

VÝSLEDKY

Průměrné hodnoty spontánních revertant (NK – negativní kontrola) u kmene *S. typhimurium* TA98 byly $32,3 \pm 7,2$ bez metabolické aktivace a s metabolickou aktivací $38,6 \pm 8,5$. U kmene *S. typhimurium* TA100 byly průměrné hodnoty spontánních revertant $133,7 \pm 26,3$ bez metabolické aktivace a $158,6 \pm 27,0$ s metabolickou aktivací (NK). Průměrné počty revertant testovaných látek ve všech sledovaných koncentracích a hodnoty koeficientu *K* jsou uvedeny v tab. I.

α -angelikalakton nevykazoval u obou kmenů v Amesově testu žádnou mutagenní aktivitu ani s metabolickou aktivací, ani bez ní. V koncentraci 50,0 μg způsoboval u kmene TA100 bez metabolické aktivace inhibici dělení. Koncentrace 10,0 μg indukovala u kmene TA100 bez metabolické aktivace mírné, statisticky nevýznamné zvýšení počtu reverzních mutací proti negativní kontrole.

Extrakt z kořene *Archangelica officinalis* nevykazoval u obou kmenů v Amesově testu žádnou mutagenní aktivitu ani s metabolickou aktivací, ani bez ní. Rovněž statisticky nevýznamné byly rozdíly ve frekvenci revertant mezi oběma kmeny.

Juglon – nejvyšší sledované koncentrace měly výrazný toxický efekt u obou testovacích kmenů bez metabolické aktivace. Koncentrace 0,5 μg indukovala u kmene TA100 bez metabolické aktivace statisticky významné zvýšení

I. Počty revertant u kmenů TA98 a TA100 *Salmonella typhimurium* po ovlivnění α -angelicalaktonem, extraktem z kořene *Archangelica officinalis*, juglonem, extraktem z květenství *Humulus lupulus*, emodinem, hypericinem a psoralenem – Counts of revertants in strains TA98 and TA100 of *Salmonella typhimurium* after exposure to the effects of α -angelicalactone, extract from *Archangelica officinalis* root, juglone, extract from the heads of *Humulus lupulus*, emodin, hypericin and psoralene

Testovaná látka ¹	Dávka [μ g/misku] ²	Kmen ³ <i>S. typhimurium</i> TA98				Kmen <i>S. typhimurium</i> TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
		počet revertant ⁴	K	počet revertant	K	počet revertant	K	počet revertant	K
α -angelikalakton	50,0	toxický efekt ⁵	–	41,5 \pm 10,4	1,0	toxický efekt	–	191,2 \pm 73,9	1,2
	10,0	25,5 \pm 5,7	1,0	49,2 \pm 5,0	1,2	282,6 \pm 86,2	1,9	181,0 \pm 44,4	1,1
	5,0	28,2 \pm 7,7	1,1	44,7 \pm 4,9	0,7	153,8 \pm 39,0	1,0	164,0 \pm 27,8	1,0
Extrakt z kořene ⁵ <i>Archangelica officinalis</i>	50,0	20,1 \pm 2,8	1,0	24,9 \pm 2,6	0,9	208,3 \pm 22,9	1,3	270,0 \pm 77,1	1,3
	10,0	23,3 \pm 2,2	1,1	29,1 \pm 6,0	1,1	223,0 \pm 31,7	1,3	236,8 \pm 21,1	1,2
	5,0	20,9 \pm 3,7	1,0	30,2 \pm 5,3	1,1	201,0 \pm 38,4	1,2	230,2 \pm 22,4	1,1
Juglon	1,0	toxický efekt	–	27,7 \pm 15,6	0,6	toxický efekt	–	255,7 \pm 56,6	1,4
	0,5	13,3 \pm 0,5	0,5	33,0 \pm 2,2	0,7	365,6 \pm 59,0	2,3	189,3 \pm 36,5	1,1
	0,1	22,5 \pm 2,2	0,8	42,3 \pm 7,8	0,9	154,2 \pm 58,8	1,0	187,5 \pm 32,8	1,0
	0,05	22,7 \pm 9,7	0,8	44,5 \pm 3,3	1,0	174,8 \pm 76,4	1,1	194,5 \pm 38,4	1,1
Extrakt z květenství <i>Humulus lupulus</i>	50,0	24,4 \pm 2,4	1,0	32,6 \pm 4,5	1,0	115,0 \pm 12,1	0,9	123,9 \pm 5,1	0,9
	10,0	22,7 \pm 3,4	0,9	33,7 \pm 7,3	1,0	118,6 \pm 9,6	0,9	128,8 \pm 10,8	1,0
	5,0	21,4 \pm 3,5	0,9	33,0 \pm 5,0	1,0	116,3 \pm 10,0	0,9	125,4 \pm 6,1	0,9

Testovaná látka ¹	Dávka [μg/misku] ²	Kmen ³ <i>S. typhimurium</i> TA98				Kmen <i>S. typhimurium</i> TA100			
		-S9		+S9		-S9		+S9	
		počet revertant ⁴	K	počet revertant	K	počet revertant	K	počet revertant	K
Emodin	50,0	40,8 ± 9,7	1,0	68,0 ± 10,3	1,1	144,4 ± 12,5	1,0	179,0 ± 11,3	1,0
	10,0	46,6 ± 8,0	1,1	57,7 ± 10,8	0,9	159,3 ± 20,0	1,1	183,0 ± 7,5	1,0
	5,0	45,7 ± 7,7	1,1	69,6 ± 5,2	1,1	163,3 ± 9,1	1,1	194,6 ± 7,7	1,1
Hypericin	50,0	33,7 ± 10,5	1,0	47,3 ± 13,7	1,0	158,7 ± 41,7	1,0	179,9 ± 40,2	0,9
	10,0	36,9 ± 9,3	1,1	50,9 ± 10,1	1,1	157,0 ± 59,6	0,9	177,2 ± 39,4	0,9
	5,0	37,0 ± 6,7	1,1	54,1 ± 12,9	1,2	170,4 ± 46,1	1,0	190,4 ± 52,1	0,9
Psoralen	100,0	46,1 ± 13,9	1,1	52,3 ± 6,3	0,9	154,5 ± 22,6	1,0	179,4 ± 29,5	0,9
	10,0	43,8 ± 8,7	1,1	58,3 ± 11,8	1,0	161,2 ± 23,9	1,0	166,7 ± 33,5	0,8
	1,0	43,0 ± 7,9	1,1	57,7 ± 12,7	1,0	152,2 ± 26,7	0,9	174,8 ± 28,9	0,9
	0,1	44,0 ± 7,7	1,1	56,8 ± 7,2	1,0	151,1 ± 33,0	0,9	163,9 ± 29,8	0,8
	0,01	40,0 ± 7,8	1,0	48,0 ± 8,9	0,8	153,3 ± 18,7	1,0	165,6 ± 33,9	0,8

-S9 = bez metabolické aktivace S9 frakcí jaterního homogenátu – without metabolic activation of S9 fractions of liver homogenate

+S9 = s metabolickou aktivací S9 frakcí jaterního homogenátu – with metabolic activation of S9 fractions of liver homogenate

K = poměr četnosti indukovaných a spontánních revertant – ratio of induced and spontaneous revertants

¹tested substance; ²dose (mg/dish); ³strain; ⁴revertant counts; ⁵toxicity effect

počtu reverzních mutací proti negativní kontrole. Ve všech ostatních případech nedošlo ke statisticky významnému zvýšení počtu revertant proti negativní kontrole.

Extrakt z květenství *Humulus lupulus* v žádné z testovaných dávek nevykazoval v Amesově testu mutagenní aktivitu ani s metabolickou aktivací, ani bez ní. Rovněž statisticky nevýznamné byly rozdíly mezi frekvencí revertant u obou kmenů.

Rovněž u emodinu nebyly zjištěny v Amesově testu u obou kmenů žádné mutagenní účinky s metabolickou aktivací ani bez ní. Rovněž statisticky nevýznamné byly u obou kmenů rozdíly mezi frekvencí revertant.

Hypericin rovněž neindukoval žádné statisticky významné zvýšení počtu revertant s metabolickou aktivací ani bez ní u obou kmenů *S. typhimurium*. Statisticky nevýznamné byly rozdíly mezi frekvencí revertant u kmenů TA98 a TA100.

Psoralen neindukoval v žádné z testovaných koncentracích statisticky významné zvýšení počtu revertant s metabolickou aktivací ani bez ní u obou kmenů *S. typhimurium*. Rovněž statisticky nevýznamné byly rozdíly ve frekvenci revertant mezi kmeny TA98 a TA100.

Mikronukleus test

Průměrné zjištěné počty mikrojadern v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeni u kontrolních skupin zvířat byly $2,9 \pm 1,6$ (7% DMSO) a $2,2 \pm 1,5$ (olivový olej). Rozdíly mezi samci a samicemi byly statisticky zhodnoceny a ani v jednom případě nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi oběma pohlavími. Rozdíly nebyly statisticky významné na hladině významnosti $\alpha = 0,01$. Uvedené výsledky jsou průměrnými sumárními výsledky za obě pohlaví. Zjištěné rozdíly mezi testovanými látkami a kontrolními skupinami byly hodnoceny *t*-testem při hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

α -angelikalakton indukoval ve všech testovaných dávkách (0,14, 0,28, 1,4, 2,1 a 2,8 g/kg tělesné hmotnosti) a v obou sledovaných časových intervalech (48 a 72 h po podání) statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern ve srovnání s kontrolní skupinou.

Extrakt z kořene *Archangelica officinalis* naopak neindukoval statisticky významně zvýšenou tvorbu mikrojadern u žádné skupiny zvířat ani u jedné z testovaných dávek (0,22, 1,1 a 1,6 g/kg tělesné hmotnosti) a v žádném z obou sledovaných časových intervalů. Vyšší koncentrace indukovaly nižší

počty mikrojadern. Průměrné počty mikrojadern indukované nejvyšší koncentrací (1,6 g/kg tělesné hmotnosti) se téměř nelišily od dolní hranice kontrolní skupiny

Juglon indukoval statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern pouze u nejvyšší z testovaných dávek (0,08 g/kg), a to v obou sledovaných časových intervalech.

Extrakt z květenství *Humulus lupulus* indukoval statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern 48 h po podání pouze u nejnižší dávky (0,018 g/kg). Po 72 hodinách se frekvence mikrojadern významně zvýšila u skupin zvířat, jímž byly podány dávky 0,185 a 0,018 g/kg (nejvyšší a nejnižší). U ostatních skupin zvířat se frekvence mikrojadern statisticky významně nelišily od frekvence mikrojadern kontrolní skupiny.

Emodin indukoval statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern 48 h po podání u dvou dávek (0,015 a 0,007 g/kg tělesné hmotnosti), zatímco u třetí, nejnižší (0,0038 g/kg), se frekvence mikrojadern statisticky významně nelišily od frekvence mikrojadern kontrolní skupiny. Po 72 hodinách se frekvence mikrojadern významně zvýšila u všech skupin zvířat (jímž byly podány dávky 0,015, 0,007 a 0,0038 g/kg).

Hypericin indukoval ve všech testovaných dávkách (0,008, 0,004 a 0,002 g na 1 kg tělesné hmotnosti myši) a v obou sledovaných časových intervalech (48 a 72 h po podání) statisticky významně zvýšenou frekvenci mikrojadern ve srovnání s kontrolní skupinou.

Psoralen byl testován 24 h po podání pokusným zvířatům. Indukoval statisticky významně zvýšenou tvorbu mikrojadern u všech testovaných dávek (0,02, 0,04 a 0,08 g/kg).

Průměrné hodnoty mikrojadern v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeně všech testovaných látek a mutagenní aktivita jednotlivých dávek jsou shrnuty v tab. II.

DISKUSE

V řadě prací je popsána mutagenní aktivita angelicinu, zejména ve vztahu k UV záření (UVA). Kromě fotosenzibilizace vyvolává zvýšené riziko výskytu kožních nádorů (Pierceal et al., 1992; Koch et al., 1994). Salikhova et al. (1993) sledovali efekt vodního i lihového extraktu z rostliny

II. Počty mikrojader v polychromatofilních erythrocytech kostní dřeně po ovlivnění extraktem z kořene *Archangelica officinalis*, α -angelikalaktonem, juglonem, extraktem z květenství *Humulus lupulus*, emodinem, hypericinem a psoralenem – Count of micronuclei in polychromatophilic erythrocytes of bone marrow after influence with extract from *Archangelica officinalis* root, α -angelicalactone, juglone, extract from *Humulus lupulus*, emodin, hypericin and psoralene

Testovaná látka ¹	Dávka ² [g.kg ⁻¹]	Počty mikrojader ³	Mutagenita ⁴ (<i>p</i> = 0,05)	Dávka [g.kg ⁻¹]	Počty mikrojader	Mutagenita (<i>p</i> = 0,05)
	po ⁶ 48 h			po 72 h		
<i>Archangelica officinalis</i> – extrakt ⁵	1,6	0,9 ± 1,0	–	1,6	1,7 ± 1,5	–
	1,1	1,4 ± 0,8	–	1,1	2,5 ± 1,4	–
	0,22	1,6 ± 1,4	–	0,22	3,0 ± 2,0	–
α -angelikalakton	2,1	6,5 ± 2,3	+	2,1	8,0 ± 2,9	+
	1,4	5,8 ± 3,0	+	1,4	7,8 ± 2,9	+
	0,28	7,5 ± 2,3	+	0,28	8,5 ± 1,8	+
	0,14	6,0 ± 2,4	+	0,14	7,3 ± 3,8	+
Juglon	80,0	4,3 ± 1,9	+	80,0	4,3 ± 2,3	+
	40,0	3,3 ± 1,5	–	40,0	2,9 ± 1,7	–
	20,0	3,7 ± 2,2	–	20,0	3,5 ± 1,5	–
<i>Humulus lupulus</i> – extrakt	185,0	2,8 ± 1,7	–	185,0	5,5 ± 2,5	+
	92,0	3,2 ± 1,5	–	92,0	2,8 ± 1,5	–
	18,0	3,9 ± 1,3	+	18,0	4,0 ± 1,5	–
Emodin	15,0	4,0 ± 1,7	+	15,0	4,6 ± 1,7	+
	7,0	4,0 ± 1,7	+	7,0	5,4 ± 1,5	+
	3,8	–	–	3,8	5,5 ± 2,0	+
Hypericin	8,0	6,3 ± 2,5	+	8,0	5,1 ± 2,6	+
	4,0	4,5 ± 1,5	+	4,0	5,1 ± 2,4	+
	2,0	6,3 ± 2,0	+	2,0	4,9 ± 2,9	+
Psoralen	80,0	6,0 ± 1,8	+	–	–	–
	40,0	5,7 ± 2,4	+	–	–	–
	20,0	4,8 ± 1,3	+	–	–	–

¹tested substance; ²dose; ³counts of micronuclei; ⁴mutagenicity; ⁵extract from *Archangelica officinalis* root; ⁶after

Angelica archangelica mikronukleus testem za použití thio-TEPA jako mutagenu a prokázali jejich antimutagenní účinky. Z našich výsledků vyplývá, že extrakt kořene anděliky *Archangelica officinalis* v použitých testovacích systémech nejevil mutagenní aktivitu ani v Amesově testu, ani při použití mikronukleus testu.

Podobně jako u jiných rostlinných látek, je též u anděliky pozorován rozdíl v mutagenním efektu lihového extraktu (tinktura) a extraktu vodního (infusum). Jde o rozdílný podíl látek přecházejících ze suché drogy do roztoku. Anděliková tinktura vykazuje nižší mutagenní aktivitu než infusum. Také při stejném množství angelicinu v různém prostředí jsou pozorovány rozdíly v účinku (Göggelmann, Schimmer, 1986). V testech s kmeny TA104 a TA102 se ukazuje angelicin jako oxidativní mutagen (Koch et al., 1996).

Hypericin je možné považovat za mutagenní ze sledování, při němž jsme použili mikronukleus test. V našich výsledcích nevykazuje hypericin při Amesově testu mutagenní aktivitu. Tyto výsledky neodpovídají nálezům, které uvádějí Göggelmann a Schimmer (1986), kteří prokázali u TA98 a TA100 s metabolickou aktivací i bez ní u hypericinu silný mutagenní efekt.

Výsledný efekt hypericinové tinktura a extraktu může být rozdílný podle podílu látek, které přecházejí do těchto roztoků. Některé látky přítomné v extraktu nebo v tinktuře mohou ovlivnit genotoxicitu hypericinu. Jedná se především o kvercetin, který ačkoliv sám vykazuje poměrně silnou mutagenní aktivitu a je považován za karcinogen (Pamuku, Yalciner, 1980), může působit jako antimutagen a antikarcinogen v interakci s jinými látkami (Ogawa et al., 1985). Rovněž Schimmer et al. (1994) považují za hlavní složku mutagenní aktivity hypericinové tinktura kvercetin.

U hypericinu jsou často prokazovány antikarcinogenní účinky. Hypericin působí antiproliferačně (Samei et al., 1996) a snižuje aktivitu epidermálního růstového faktoru (EGF-R) (Richter, Davies, 1995; Vandenberg et al., 1996).

V našich výsledcích vykazoval juglon ve vyšších koncentracích v Amesově testu cytotoxický efekt. Nižší koncentrace u TA100 bez metabolické aktivity S9 vyvolávala výrazné zvýšení počtu reverzních mutací. Tyto výsledky odpovídají charakteru účinku juglonu jak v cytotoxicitě, tak v indukci volných kyslíkových radikálů. Ve sledování, při němž jsme použili mikronukleus test, byla mutagenní aktivita juglonu na hranici významnosti.

Extrakt ze samčího květenství chmelu otáčivého (*Humulus lupulus*) při sledování mutagenní aktivity u TA98 a TA100 s metabolickou aktivací i bez ní, se jeví jako slabý mutagen (Göggelmann, Schimmer, 1994). Podle našich výsledků se extrakt chmele zdá být nemutagenní. Při sledování v mikronukleus testu vykazoval chmelový extrakt slabé mutagenní účinky, a to i při nižších koncentracích. Jsou prokazovány také antikarcinogenní účinky humulonu (Yusukawa et al., 1995).

V řadě prací byly u emodinu prokazovány účinky antimutagenní a antikarcinogenní. Su et al. (1995) pozorovali inhibici mutagenní aktivity a tvorby DNA adduktů po působení 1-nitropyrenu. Mnohé práce však mutagenní aktivitu emodinu neprokazují (Sanders et al., 1992; Heidenmann et al., 1993). V našich výsledcích se emodin zdá být v mikronukleus testu jako mutagenní, což odpovídá výsledkům, které uvádějí Krivobok et al., (1992). V Amesově testu při našem sledování nebyla zjištěna mutagenní aktivita emodinu, což se shoduje s výše uvedenými pracemi (Su et al., 1995; Sanders et al., 1992; Heidenmann et al., 1993).

Závěr

Výsledky sledování přírodních látek prokazují, že je možné v řadě druhů rostlin, ať požívaných jako zelenina, nebo jako koření či léčivé byliny, předpokládat výskyt látek vykazujících mutagenní aktivitu za podmínek *in vivo* i *in vitro*.

V některých případech jsou pozorovány rozdíly v mutagenní aktivitě izolovaných látek a extraktů či výluhů z celých rostlin nebo jejich částí, kořene, listů, semen apod. V těch případech závisí výsledný efekt na podílu dalších látek v extraktech nebo výluzích a na jejich aktivitě, která může antimutagenním působením potlačit vliv mutagenní látky, zejména pokud se vyskytuje v nízké koncentraci, nebo naopak její účinek zvyšovat, je-li přítomna v extraktu či výluhu další látka potencující mutagenní efekt. Za příklad může sloužit kvercetin v kombinaci s hypericinem.

Dalším významným biologickým jevem je skutečnost, že mnohé látky v závislosti na podmínkách se mohou chovat různě. Mohou se projevat jako mutagenní nebo antimutagenní, případně bez prokazatelného pozitivního či negativního mutagenního efektu. Zde záleží nejen na kombinovaném účinku jednotlivých látek, ale i na vlivu času. Faktor času nevystupuje pouze

v době, po kterou daná látka působí, ale i v okamžiku, kdy ta která látka začne působit. V tom lze spatřovat období vzájemného působení iniciátorů a promotorů ve vícestupňovém karcinogenním procesu, kdy často rozhoduje pořadí v nástupu efektu.

Výsledky sledování přispěly do mozaiky risk assesement – hodnocení rizika přívodu mutagenních látek do lidského organismu. Poukázaly i na nutnost brát při hodnocení zdravotní bezpečnosti a zdravotního rizika v úvahu výskyt těchto látek a možnost jejich přívodu do lidského organismu a také dávají podněty pro risk management – omezení použití některých látek do potravních doplňků, zejména pro děti, případně cílené snižování obsahu látek rostlinného původu vykazujících mutagenní aktivitu v přípravcích pro běžné použití.

L i t e r a t u r a

- AGOSTINIS, P. – DONELLA-DEANA, A. – CUVEELE, J. – VANDENBOGAERDE, A. – SARNO, S. – MERLEVEDE, W. – DE WITTE, P.: A comparative analysis of the photosensitized inhibition of grow-factor regulated protein kinases by hypericin derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 220, 1996: 613–617.
- AMES, B. N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221, 1983: 1256–1263.
- AMES, B. N. – GOLD, L. S.: Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.*, 250, 1991: 3–16.
- AMES, B. N. – PROFET, M. – SWIRKY GOLD, L.: Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1990: 7777–7781.
- BJELDANES, L. F. – CHANG, G. W.: Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, 197, 1977: 577–578.
- COHEN, P. A. – HUDSON, J. B. – TOWERS, G. H.: Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichen. *Experientia*, 52, 1996: 180–183.
- ČERNÁ, M. – DOBIÁŠ, L. – HÁJEK, V.: Amesova metoda. V: Metody biologického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí – standardní metodika. *Acta Hyg., Epidemiol., Microbiol. (Příloha)*, 20, 1989: 33–56
- DECD Guidelines for testing of chemicals 474 – Genetic Toxicology. Micronucleus Test. 1983. Council Directive 84/449/EEC. Part B. Methods for the determination of toxicity. B 12 Other effect – Mutagenicity (micronucleus test).

FREDENHAGER, A. – METT, H. – MEYER, T. – BUCHUNDER, E. – REGENASS, U. – ROGGO, B. E. – PETERSEN, F.: Protein tyrosine kinase and protein kinase C inhibition by fungal anthraquinones related to emodin. *J. Antibiot.*, **48**, 1995: 1355–1358.

FUNG, V. A. – BARRETT, J. C. – HUFF, J.: The carcinogenesis bioassay in perspective: Application in identifying human hazards. *Environ. Health Persp.*, **103**, 1995: 680–683.

GREGOR, J. M. S. – HEDDLE, J. A. – HITE, M. – MARGOLIN, B. H. – RAMEL, C., SALAMONE, M. F. – TICE, R. R. – WILD, D.: Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Res.*, **189**, 1987: 103–112.

GÖGGELMANN, W. – SCHIMMER, O.: Mutagenic activity of phyto-therapeutical drugs. In: KNUDSEN, Ib. (Ed.): *Genetic Toxicology of the Diet. Progress in Clinical and Biological Res.* Vol. 206, New York, Alan R. Liss, Inc. 1986: 351 s.

HANNUKSELA, M. – STENBACK, F. – LATHI, A.: The carcinogenic properties of topical PUVA. *Arch. Dermatol. Res.*, **278**, 1986: 347–351.

HARRIS, M. S. – SAKAMOTO, T. – KIMURA, H. – HE, S. – SPEE, C. – GOPALAKRISHMA, R. – GUNDIMEDA, U. – YOO, J. S. – HINTON, D. R. – RYAN, S. J.: Hypericin inhibits cell growth and induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells: possible involvement of protein kinase C. *Curr. Eye Res.*, **15**, 1996: 255–262.

HEIDENMANN, A. – MIETEBURGER, H. G. – MENGES, U.: The genotoxicity status of senna. *Pharmacology*, **47**, suppl.1, 1993: 178–186.

KOCH, W. H. – HENRIKSON, E. N. – CEBULA, T. A.: Molecular analysis of *Salmonella* his G 428 ochre revertants for rapid characterization of mutational specificity. *Mutagenesis*, **11**, 1996: 341–348.

KOCH, W. H. – HENRIKSON, E. N. – KUPCHELLA, E. – CEBULA, T. A.: *Salmonella typhimurium* strain TA 100 differentiates several classes of carcinogens and mutagens by base substitution specificity. *Carcinogenesis*, **15**, 1994: 79–88.

KRIVOBOK, S. – SEIGLE-MURANDI, F. – STEIMAN, R. – MARZIN, D. R. – BETINA, V.: Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. *Mutat. Res.*, **279**, 1992: 1–8.

MARON, D. M. – AMES, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, **113**, 1983: 173–215.

MISKOVSKY, P. – SUREAU, F. – CHINSKY, L. – TURPIN, P. Y.: Subcellular distribution of hypericin in human cancer cells. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 1996: 546–549.

O'BRIEN, P. J.: Molecular mechanism of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interactions*, **80**, 1991: 1–41.

- OGAWA, O. – HIRAYAMA, T. – NOHARA, M. – TOKUDA, M. – HIRAI, K. – FUKUI, S.: The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo/a/pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutation Res.*, 142, 1985: 103–107.
- PAMUKU, A. M. – YALCINER, S.: Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilium*). *Cancer Res.*, 40, 1980: 3468–3472.
- PIERCEALL, W. E. – KRIPKE, M. L. – ANANTHASWAMY, H. N.: N-ras mutation in ultraviolet radiation - induced murine skin cancers. *Cancer. Res.*, 52, 1992: 3946–3951.
- RICHTER, A. – DAVIES, D. E.: Effects of anthralin and hypericin on growth factor signalling and cell proliferation *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.*, 50, 1995: 2039–2045.
- SALIKHOVA, R. A. – DULATOVA, SH. N. – POROSHENKO, G. G.: Study of the antimutagenic properties of *Angelica archangelica* by the micronucleus test. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 115, 1993: 371–372.
- SAMEL, D. – DONNELLA-DEANA, A. – DE WITTE, P.: The effect of purified extract of *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) on protein kinases involved in signal transduction pathways. *Planta Med.*, 62, 1996: 106–110.
- SANDERS, D. – JOHANSEN, T. – TEIEN, G. – ULSAKER, G.: Mutagenicity of crude senna glykosides in *Salmonella typhimurium*. *Pharmacol. Toxicol.*, 71, 1992: 165–172.
- SCHEEL, L. D. – PERONE, V. B. – LARKIN, R. L.: The isolation and characterization of two phototoxic furanocoumarins (psoralens) from diseased celery. *Biochemistry*, 2, 1963: 1127–1133.
- SCHIMMER, O. – KRUGER, A. – PAULINI, H. – HEAFELE, F.: An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Pharmazie*, 49, 1994: 448–451.
- SCHMID, W.: The Micronucleus test. *Mutation Res.*, 31, 1975: 9–15.
- SMITH, D. M.: Toxicity of phytoalexins. In: BAILEY, J. A. – MANSFIELD, J. W. (Eds): *Phytoalexins*. New York, John Wiley and Sons 1982: 218 s.
- SU, H. Y. – CHERNG, S. H. – CHEN, C. C. – LEE, H.: Emodin inhibits the mutagenicity and DNA adducts induced by 1-nitropyrene. *Mutat. Res.*, 329, 1995: 205–212.
- VANDENBOGAERDE, A. L. – GEBOES, K. R. – CUVEELE, J. F. – AGOSTINIS, P. M. – MERLEVEDE, W. J. – DE WITTE, P. A.: Antitumour activity of photosensitized hypericin on A 431 cell xenografts. *Anticancer. Res.*, 16, 1996: 1619–1625.
- WEISBURGER, E. K.: Natural carcinogenic products. *Environ. Sci. Technol.*, 13, 1979: 278–281.
- WRIGHT, A. von – RAATIKAINEN, O. – TAIPALE, H. – KARENLAMPI, S. – MAKIPAKKANEN, J.: Directly acting geno- and cytotoxic agents from a wild mushroom *Dermocybe sanguinea*. *Mutat. Res.*, 269, 1992: 27–33.

WU, C. M. – KOEHLER, P. E. – AYRES, J. C.: Isolation and identification of xanthotoxin (8-methoxypsoralen) and bergapten (5-methoxypsoralen) from celery infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Microbiol., 23, 1972: 852–856

YUSUKAWA, K. – TAKEUCHI, M. – TAKIDO, M.: Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-0-tetradecanoylphorbol-13 acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Oncology, 52, 1995: 156–158.

Došlo 27. 5. 1997

Kontaktní adresa:

MUDr. Bohumil Turek, CSc., Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, Česká republika
tel.: 00 420 2 6708 2317, fax: 00 420 2 673 102 91

CHRÓM A NIKEL VO VÝROBNOM PROCESSE SYROV

Chromium and Nickel in Production Process of Cheeses

Mária KOREŇOVSKÁ, Patricia ZAUŠKOVÁ

Food Research Institute, Bratislava, Slovak Republic

Abstract: The distribution of chromium and nickel was studied in different fractions of cow's milk, obtained after fractionation by centrifugation and coagulation with enzyme for curdle. 7,6% of chromium, 8% of nickel went to the cream, 36% of chromium, 47% of nickel went to the casein and whey contained 57% of chromium, 43% of nickel. The technological process of hard cheeses and processed cheeses was studied in dairies at Zvolen and Senica. This study confirmed the influence of cumulation of metals in particular fractions and reality a of new hygienic limit for category "dairy products" 0,50 mg/kg for Cr and Ni.

chromium, nickel, distribution; fraction; milk; cheese; production process of cheeses

Abstrakt: V práci je sledovaná distribúcia chrómu a niklu v jednotlivých frakciách mlieka, získaných frakcionáciou pomocou odstredovania a zrážania syridlom. V smotane bolo nameraných 7,6 % chrómu, 8 % niklu, v kazeíne 36 % chrómu, 47 % niklu a v srvátke 57 % chrómu, 43 % niklu. Sledovaný je výrobný proces tvrdých a tavených syrov v mliekárni Zvolen a Senica, ktorý potvrdil vplyv kumulácie kovov do jednotlivých frakcií a realnosť nového hygienického limitu pre kategóriu „mliečné výrobky“ 0,5 mg/kg pre chróm a nikel.

chróm; nikel; distribúcia; frakcionácia; mlieko; syry; výrobný proces syrov

Monitorovaním obsahov chrómu a niklu v mliečnych výrobkoch v rokoch 1995 a 1996 sme zistili, že tvrdé a tavené syry majú najvyšší obsah týchto prvkov a prekračujú platný hygienický limit. Preto sme sa zamerali na sledovanie chrómu a niklu vo výrobnom procese syrov s cieľom zistiť, či je reálne postavený hygienický limit pre množstvo chrómu a niklu. V predchádzajúcej práci sme sledovali distribúciu chrómu a niklu pri kyslom zrážaní (Koreňovská et al., 1997), ale nakoľko v technologickom procese výroby syrov sa používa častejšie zrážanie syridlom, v tejto práci sledujeme obsah Cr a Ni vo frakciách vzniknutých v zrážaní syridlom.

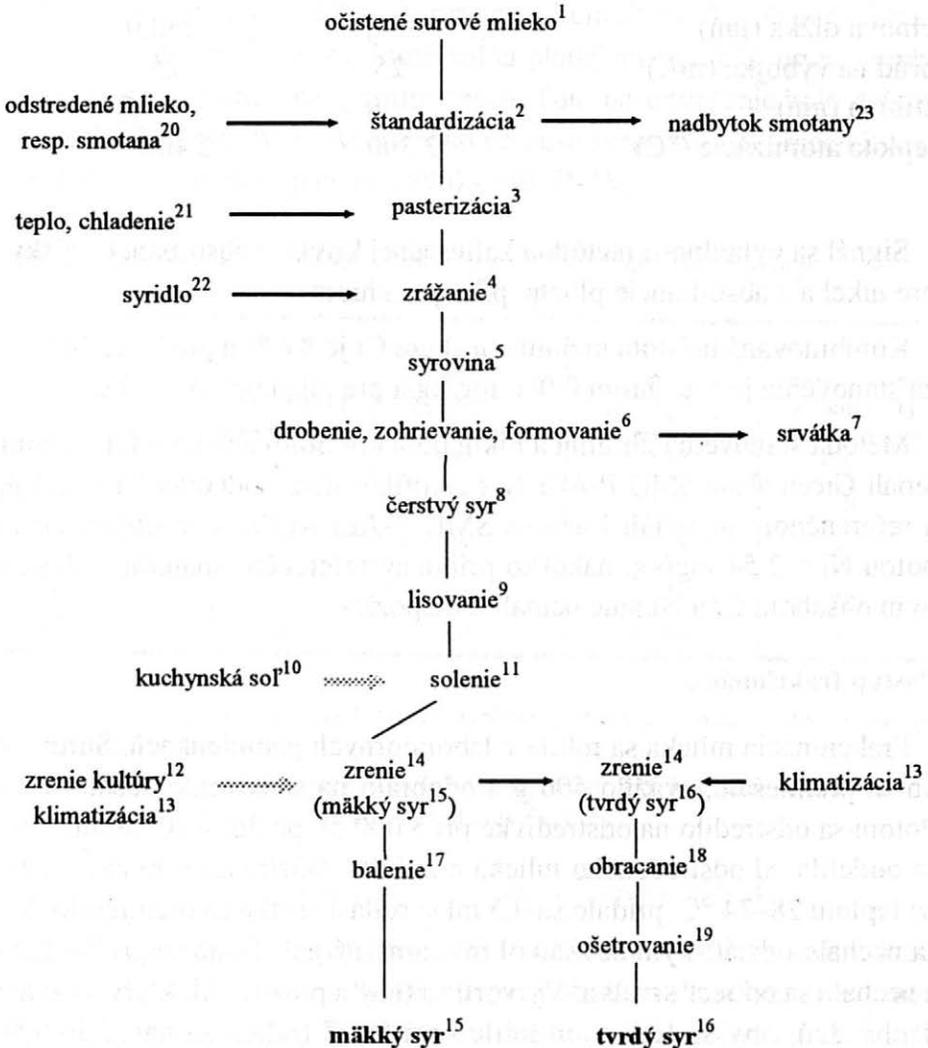
Syry sa vyrábajú z mlieka, ktoré pochádza od zdravých, dobre živých dojníc. Mlieko s nevhodným zložením, ktoré je často zapríčinené zápalmi vemien dojníc, má znížený obsah kazeínu, kyseliny fosforečnej a vápnika, čo sťažuje syrenie a syrenina je veľmi mäkká. Mlieko nesmie mať zvýšenú kyslosť ani vysoký počet mikroorganizmov. Podľa našich technologických postupov sa môžu všetky druhy syrov vyrábať len z pasterizovaného mlieka, kde je povolená krátkotrvajúca pasterizácia pri teplote 75 °C po dobu 30 s. Pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syrovinou s tvorbou ôk v ceste (ementálsky, moravský bochník) sa do mlieka pridávajú termofilné baktérie kultúry *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus lactis* a propiónové baktérie, ktoré sú podmienkou správnej tvorby ôk. Pri výrobe kyslých a čerstvých syrov sa mlieko zráža buď vplyvom kyseliny mliečnej vytvorenej z laktózy mliečnou fermentáciou, syridlovým enzýmom chymozínom (najmä tvrdé syry), alebo pôsobením obidvoch faktorov v rôznych vzájomných pomeroch (ostatné syry). Mlieko sa zráža v syrárskych vaniach a kotloch s duplikátorovými stenami, ktoré sa môžu vyhrievať teplou vodou, resp. ochladzovať. Podľa použitej teploty, vytvorenej kyseliny mliečnej a pridaného množstva syridla trvá zrážanie 1/2 až 2 hodiny. Mlieko zrazené na tuhú, gélovitú hmotu sa pokrája na kocky a drobí na zrno. Od veľkosti zrna závisí, koľko srvátky sa uvoľní. Pri výrobe čerstvých syrov sa spracovanie končí na tomto stupni. Pri výrobe tavených syrov sa využijú všetky syry, ktoré sú chuťovo bezchybné, ale nevyhoveli po vzhľadovej stránke. Tieto sa rozomelú a dobre premiešajú. Miešaním prírodných syrov rôzneho stupňa zrelosti sa získavajú najlepšie zmesi, pretože topiace vlastnosti závisia od stupňa zrelosti suroviny. Topenie je najdôležitejšia fáza výrobného postupu. Topiace soli sa pridávajú do varného kotla. Teploty topenia sa pohybujú pri plátkoch okolo 90 °C, pre rozotierateľné výrobky dosahujú až 130 °C. Všetky zariadenia používané pri výrobe (vane, lisy, formy) sú z nehrdzavejúcej ocele, anódového hliníka alebo plastov (Drdák et al., 1996). Schéma technologického procesu výroby syra je na obr. 1.

MATERIÁL A METÓDY

Na prirodzenú distribúciu chrómu a niklu v mlieku sme použili mlieko odobrané z roľníckych družstiev okresu Banská Bystrica v mesiaci január 1996. Priemerné fyzikálno-chemické hodnoty mlieka: tuk 4,0 %, kyslosť 6,5° SH, BTS 8,81 %.

Na meranie množstva Cr a Ni sa použil atómový absorpčný spektrometer Perkin Elmer 4100 s grafitovou kyvetou HGA 700 po predchádzajúcej mineralizácii mokrou cestou v mikrovlnnom systéme Milestone MLS 1200 MEGA

1. Technologický proces výroby syra – Technological process production of cheese



¹purified raw milk; ²standardization of milk; ³pasteurization; ⁴precipitation; ⁵curds; ⁶spalling, warming, moulding; ⁷whey; ⁸fresh cheese; ⁹pressing; ¹⁰salt; ¹¹salting; ¹²seasoning of culture; ¹³conditioning; ¹⁴seasoning; ¹⁵soft cheese; ¹⁶hard cheese; ¹⁷packing; ¹⁸turn over ¹⁹treatment; ²⁰skim milk, cream respective; ²¹heat, cooling; ²²enzyme for curdle; ²³surplus of cream

(návažka 1,0 g, mineralizačná zmes 3,5 ml HNO₃ konc. a 0,5 ml H₂O₂). Všetky použité chemikálie boli čistoty p.a. a Suprapur (Merck), voda bola dvakrát destilovaná. Metóda stanovenia Cr a Ni je internou metódou akreditovaného skúšobného laboratória VÚP.

Podmienky merania na GF-AAS:

kov	Cr	Ni
vlnová dĺžka (nm)	357,9	232,0
prúd na výbojke (mA)	25	25
štrbina (nm)	0,7	0,2
teplota atomizácie (°C)	2 300	2 400

Signál sa vyhodnotil metódou kalibračnej krivky z absorbcie výšky píku pre nikel a z absorpcie plochy píku pre chróm.

Kombinovaná neistota merania (u_C) pre Cr je 8,6 % a pre Ni je 14 %. Medza stanovenia je pre chróm 0,006 mg/kg a pre nikel 0,006 mg/kg.

Metóda stanovenia chrómu a niklu bola kontrolovaná na referenčnom materiáli Green algae SMÚ P-ACHK s certifikovanou hodnotou Cr = 2,4 mg/kg a referenčnom materiáli Lucerna SMÚ P-ALFALFA s certifikovanou hodnotou Ni = 2,54 mg/kg, nakoľko príbuzný referenčný materiál s deklarovaným obsahom Cr a Ni sme nemali k dispozícii.

Postup frakcionácie

Frakcionácia mlieka sa robila v laboratórnych podmienkach. Surové mlieko sa premiešalo, zvážilo 500 g a odobralo na stanovenie obsahu Cr a Ni. Potom sa odstredilo na odstredivke pri 5 000 ot. po dobu 10 minút. Smotana sa oddelila od odstredeného mlieka a zvážila. Odstredené mlieko sa ohrialo na teplotu 28–34 °C, pridalo sa 0,5 ml syridla a všetko sa premiešalo. Mlieko sa nechalo odstáť, kým nevznikol rovnomerný gél. Tento sa preliel cez gázu a nechala sa odteciť srvátka. Vytvoril sa tuhý a pružný gél, ktorý sa zväžil na druhý deň, aby sa lepšie oddelila srvátka. Z frakcii sa navážilo 0,5–2 g, pridala sa mineralizačná zmes 3 ml koncentrovaná HNO₃ a 0,5 ml H₂O₂ a po zmineralizovaní v mikrovlnnom rozkladnom systéme sa obsah kvantitatívne preniesol do 10ml odmerných baniek, doplnil destilovanou vodou po rysku a zmeral. Syridlo obsahovalo 0,05 mg Ni a 0,004 mg Cr v 1 kg.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané obsahy chrómu a niklu sú uvedené v tab. I. Obsah chrómu vo frakciách je približne rovnaký ako pri kyslom zrážaní, ale obsah niklu sa zmenil. V smotane bol tiež približne rovnaký 8 %, ale v kazeíne bol zvýšený na 47 %. V srvátke sa znížil na 44 %. V predchádzajúcej práci (Koreňovská et al., 1997) sme vypočítali, že pri danej kumulácii Cr a Ni vo frakciách mlieka nie je možné z mlieka, ktoré spĺňa platný hygienický limit, vyrobiť výrobok, ktorý by nemal nadlimitný obsah. Toto naše tvrdenie bolo dokázané na vzorkách odobratých z výrobného procesu syrov v mliekárňach Zvolen (v júni 1996) a Senica (v januári 1996) – tab. II–IV.

I. Distribúcia chrómu a niklu v mlieku – Chromium and nickel distribution in milk

Názov frakcie ¹	Chróm ⁷		Nikel ⁸	
	m [mg/kg]	\bar{x} [hmot. %]	m [mg/kg]	\bar{x} [hmot. %]
Mlieko ²	0,017	100	0,018	100
Smotana ³	0,027	7,6	0,027	8
Odstredené mlieko ⁴	0,017	88	0,018	92
Srvátka ⁵	0,008	47	0,010	44
Kazein ⁶	0,048	40	0,068	47

m = priemerný obsah kovu vo frakciách z troch stanovení – average of metal content in fractions from three determinations

\bar{x} = priemerná hodnota percentuálneho obsahu kovu v jednotlivých frakciách mlieka – average value of metal percentage content in different milk fractions

¹fraction name; ²milk; ³cream; ⁴skim milk; ⁵whey; ⁶casein; ⁷chromium; ⁸nickel

Z nameraných obsahov chrómu a niklu v mlieku, syridle, v soli, syroch a obaloch vidieť, že aj keď vstupná surovina obsahovala podlimitné množstvo Cr a Ni, výrobky z nej vyrobené boli na hranici platného hygienického limitu, alebo ho prekročili. Syridlo vzhľadom na obsah Cr a Ni nekontaminovalo syry. V Senickej mliekárni obsah niklu bol relatívne vyšší v používaných soliach, ale vzhľadom na malé množstvo soli, ktoré sa vo výrobnom procese syrov spotrebuje, nemôže výrazne ovplyvniť obsah chrómu a niklu.

II. Výrobný proces Eidamskej tehly (mliekárň Senica január 1996) – Production process of Eidam (Senica dairy in January 1996)

Názov vzorky ¹	m_{Cr} [mg/kg]	m_{Ni} [mg/kg]
Surové mlieko ²	0,023	0,020
Syridlo ³	0,042	0,059
Soli ⁴	0,072	0,259
Eidamská tehla I ⁵	0,096	0,231
Eidamská tehla II ⁶	0,088	0,167
Umelohmotný obal I ⁷	0,392	0,316
Umelohmotný obal II ⁸	0,355	0,114
Umelohmotný obal III ⁹	0,825	0,262

Vysvetlivky k tab. II–IV – Explanation for Table II–IV

m_{Ni} = priemerný obsah niklu vo vzorkách – average nickel content in samples

m_{Cr} = priemerný obsah chrómu vo vzorkách – average chromium content in samples

¹name of sample; ²raw milk; ³enzyme for curdle; ⁴salts; ⁵cheese Eidam I; ⁶cheese Eidam II; ⁷PE pack I; ⁸PE pack II; ⁹PE pack III

III. Výrobný proces Eidamskej tehly a Moravského bochníka (mliekarňa Zvolen v júni 1996) – Process production of Eidam and cheese Moravský bochník (Zvolen dairy in June 1996)

Názov vzorky ¹	m_{Cr} [mg/kg]	m_{Ni} [mg/kg]
Surové mlieko ²	0,013	0,007
Syridlo ³	0,021	0,017
Soli ⁴	0,031	0,073
Eidamská tehla I ⁵	0,133	0,159
Eidamská tehla II ⁶	0,142	0,333
Umelohmotný obal I ⁷	0,385	0,361
Umelohmotný obal II ⁸	0,355	0,114
Moravský bochník I ⁹	0,239	0,198
Moravský bochník II ¹⁰	0,119	0,231
Umelohmotný obal ¹¹	0,237	0,163

¹name of sample; ²raw milk; ³enzyme for curdle; ⁴salts; ⁵cheese Eidam I; ⁶cheese Eidam II; ⁷PE pack I; ⁸PE pack II; ⁹cheese Moravský bochník I; ¹⁰cheese Moravský bochník II; ¹¹PE pack

IV. Výrobný proces tavených syrov (mliekárň Zvolen v júni 1996) – Production process of processed cheeses (Zvolen dairy in June 1996)

Názov vzorky ¹	m _{Cr} [mg/kg]	m _{Ni} [mg/kg]
Mlieko z bazénu ²	0,008	0,006
Syridlo ³	0,021	0,017
Soli ⁴	0,031	0,073
Chreník tavený syr ⁵	0,107	0,166
Jana tavený syr ⁶	0,152	0,221
Bylinkový syr ⁷	0,182	0,111
Syrovit štvorcový ⁸	0,198	0,128
Syrovit obdĺžnikový ⁹	0,152	0,050,
Syrokrem štvorcový ¹⁰	0,100	0,025
Syrokrem obdĺžnikový ¹¹	0,140	0,027
Sen tavený syr ¹²	0,188	0,108
Jánošík ¹³	0,194	0,435

¹name of sample; ²adjusted milk; ³enzyme for curdle; ⁴salts; ⁵cheese „Chreník“; ⁶cheese „Jana“; ⁷cheese with herbs; ⁸cheese Syrovit I; ⁹cheese Syrovit II; ¹⁰cheese Syrokrem I; ¹¹cheese Syrokrem II; ¹²cheese Sen; ¹³cheese Jánošík

Relatívne vysoké obsahy týchto kovov boli v umelohmotných obaloch. V tomto prípade ale nepredpokladáme migráciu Cr a Ni do výrobkov vzhľadom na krátku trvanlivosť syrov.

Výrobné zariadenie taktiež zohráva dôležitú úlohu v stanovení finálnych koncentrácií stopových elementov v produktoch. Hladiny elementov ako sú Cr a Ni môžu byť ovplyvnené kovovými materiálmi, s ktorými mlieko a medzi produkty výroby syrov prichádzajú do kontaktu (C o n i et al., 1994). Úlohu tu môže zohrať aj obdobie, v ktorom sú syry vyrobené (C o n i et al., 1995), ale v našom prípade pri stanovovaní obsahu chrómu a niklu vo výrobkoch a mlieku sa to nepotvrdilo. Z nášho pohľadu tu najdôležitejšiu úlohu zohráva distribúcia kovov do jednotlivých frakcií mlieka.

Záver

Výsledky tejto práce potvrdili opodstatnenosť vzniku novej kategórie „mliečne výrobky“ a realnosť nového hygienického limitu 0,50 mg/kg pre

chróm a nikel, ktorý je publikovaný vo Vestníku MZ SR 1996, čiastka 9–13, a platný od 15. 6. 1996.

Literatúra

DRDÁK, M. – STUDNICKÝ, I. – MÓROVÁ, E. – KAROVIČOVÁ, J.: Základy potravinárskych technológií. Bratislava, vyd. Malé Centrum 1996.

CONI, E. – CAROLLI, A. – IANNI, D. – BOCCA, A.: A methodological approach to the assessment of trace elements in milk and dairy products. Food Chem., 50, 1994: 203–221.

CONI, E. – BOCCA, A. O. – IANNI, D. – CAROLLI, A.: Preliminary evaluation of the factors influencing the trace element content of milk and dairy products. Food Chem., 52, 1995: 123–130.

KOREŇOVSKÁ, M. – ZAUŠKOVÁ, P. – POLÁ ČEKOVÁ, O.: Distribúcia chrómu a niklu v mlieku. Potrav. Vědy, 15, 1997: 131–136.

Došlo 29. 4.1997

Kontaktní adresa:

RNDr. Mária Koreňovská, Výskumný ústav potravinársky

Priemyselná 4, 820 06 Bratislava, Slovenská republika

tel.: 00 421 7 543 71 40, fax: 00 421 7 526 14 17, e-mail: kovac 123@ctv.stuba.sk

PŘEHLEDY

LYSOZYM – ZAJÍMAVÁ BÍLKOVINA

Miroslav JANKOVSKÝ, Ludmila STASZKOVÁ, Jaroslav HOLOUBEK¹

Česká zemědělská univerzita v Praze – Agronomická fakulta, Katedra chemie
a ¹Katedra chovu prasat a drůbeže, Praha-Suchdol, Česká republika

Mezi jednotlivými dosud charakterizovanými složkami vaječného bílku, přesněji jeho albuminového podílu, zaujímá lysozym, jinak nazývaný muramidasa (E.C. 3.1.2.9) význačné postavení. Byl objeven A. Flemigem v roce 1922 v nosním hlenu a brzy nato v mnoha dalších tělesných sekretech, ve slezině (zejména hovězí) a ve vaječném bílku, kde je obsažen ve značné koncentraci. Je to zejména značná variabilita jeho zdrojů (míst produkce) u ptáků a savců, dnes již podrobná znalost jeho struktury a vysoká lytická aktivita, která z něj činí vysoce zajímavou sloučeninu. O jeho využití byly činěny mnohé pokusy, které omezuje jen jistá neshodnost jeho izolace ze základního zdroje – vajec.

Základní charakteristika a vlastnosti

Řetězec molekuly albuminového lysozymu je složen ze 129 aminokyselin propojených čtyřmi disulfidovými můstky. Molekulu lysozymu lze formálně rozdělit na dvě stejně velké, avšak složením rozdílné části. Izelektrický bod neštěpené molekuly má hodnotu 11. Struktura molekuly lysozymu byla objasněna studiem difrakce X paprsků v roce 1965 (Phillips, 1966). Molekula má přibližně tvar elipsoidu o rozměrech 3,0 x 3,0 x 4,5 nm.

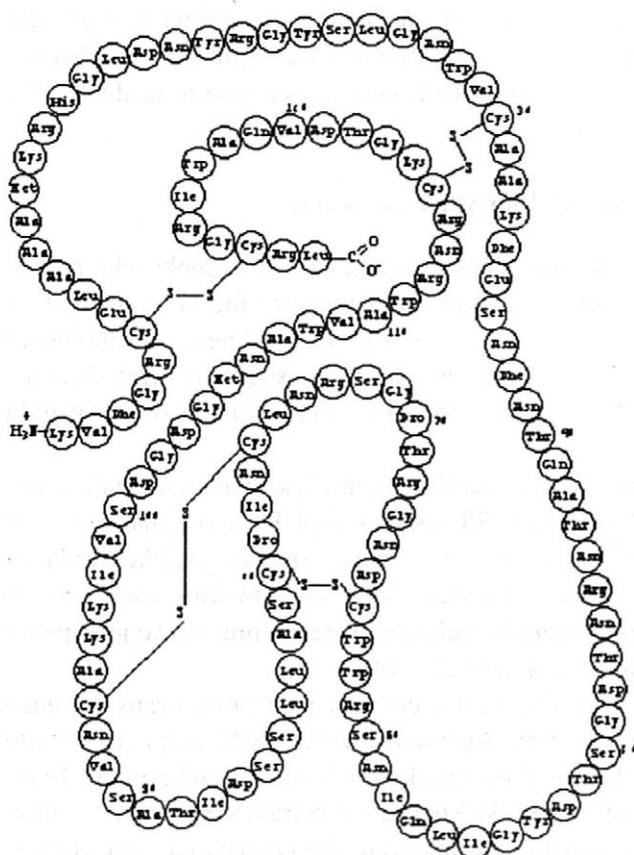
Podrobnou molekulární, zejména sekundární strukturu lysozymu studovali Kuo a Farrel (1993) pomocí FTIR spektroskopicky a získaná spektrální data konfrontovali s hodnotami vypočtenými z analýz krystalografické struktury pomocí X paprsků. Z těchto výzkumů vyplynulo, že sekundární struktura lysozymu je relativně nepravidelná, obsahuje několik helikálních segmentů, stejně jako partie typu třípramenného antiparalelního β -skládaného listu.

Za základní aminokyseliny aktivního centra enzymu jsou považovány kyselina glutamová na 35. místě řetězce a kyselina asparagová na 52. místě. Štěpení substrátu se účastní také tryptofan na místě 108. Z pozice aktivních aminokyselin plyne, že při tvorbě komplexu enzym-substrát dochází ke kontaktu substrátu s enzymem „uvnitř“ molekuly, v místě obvykle nazývaném vazebná rýha. Asociovaná část substrátu je

limitována sterickou kapacitou vazebné rýhy a odpovídá hexasacharidu, v němž dochází ke štěpení obvykle mezi 4. a 5. cukernou jednotkou (Voet, Voetová, 1990).

V čisté izolované formě je lysozym dobře rozpustný ve vodě. Fixace struktury disulfidovými můstky pak přispívá k jeho značné termostabilitě. Ve vodném neutrálním nebo slabě kyselém prostředí je schopen existence i po krátkou dobu zahřevu na 100 °C, v kyselém prostředí zůstává stabilně aktivní při 65 °C (Yashitake, Shinichiro, 1977). Stabilitu lysozymu v roztocích zvyšují polyoly a některé sacharidy (Back et al., 1979) a chlorid sodný do koncentrace 10 % (Cunningham et al., 1991).

U polypeptidů, které neobsahují čtyři disulfidové můstky a vykazují „lysozymovou účinnost“, dochází ke snížení jejich termostability (Acker, Ternes, 1993). Velká pozornost byla věnována tvorbě komplexu ovomucin – lysozym (Kato et al., 1971; Kato et al., 1978), který je stálý při pH < 9 a je v první z uvedených dvou prací podrobně popsán. Významná je tvorba komplexu lysozymu s lipovitelinem, složkou

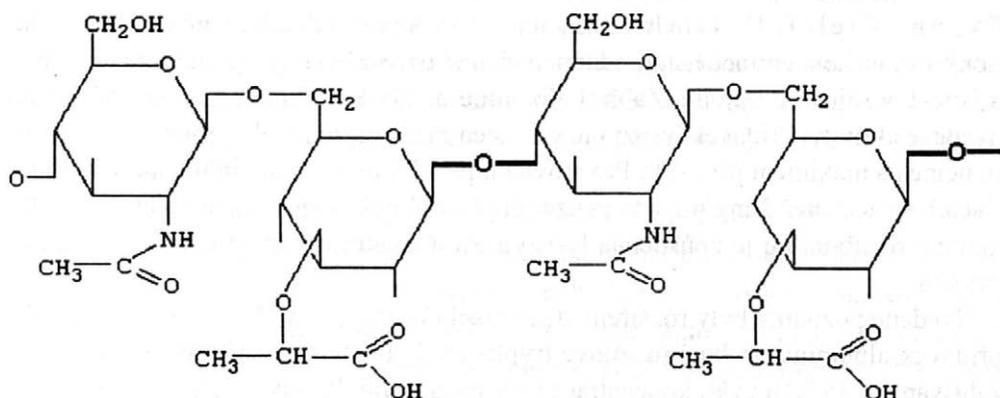


1. Schéma molekuly albuminového lysozymu

žloutku, která je z hlediska jeho role ve vejci logická, neboť tvorbou uvedeného komplexu se lysozym okamžitě inaktivuje a tak nemůže ohrozit svým lytickým působením bílkoviny zárodku. Tato reakce je již dlouho známa (Coterill et al., 1963; Cunningham, Coterill, 1964) a byla důkladně studována (např. Trziska, 1985). Intenzivní deaktivace lysozymu tvorbou jeho oligomerů je způsobována oxidačními produkty mastných kyselin. Hlavní příčinou ztráty aktivity je praktická nerozpustnost lysozymových oligomerů. Ty vznikají též při ozařování tkání obsahujících lysozym gama paprsky (Kanner, Karel, 1976). Je zřejmé, že oligomerace lysozymu je radikálového charakteru a je pravděpodobné, že zasahuje disulfidové můstky molekuly. Jiné stabilní komplexy vytváří lysozym s dalšími proteiny při vyšších teplotách, např. s ovalbuminem (Matsudomi et al., 1987).

Lytické působení

Lytický efekt, v jehož důsledku lysozym působí bakteriostaticky až baktericidně, je vysvětlován jeho schopností štěpit molekulu mureinu v místě β -1,4 glykosidové vazby N-acetylmuraminové kyseliny s N-acetylglukosaminem (Karpíak, 1986; Acker, Ternese, 1993) podle schématu:



Vazby štěpené lysozymem jsou zesíleny

Tímto štěpením se postupně hroutí řetězcová struktura mukopolysacharidů z buněčných stěn gram-pozitivních bakterií. Na účinek lysozymu jsou, jak bylo zjištěno, vysoce citlivé kmeny *Salmonella*, *Brucella*, *Klebsiela*, *Shigella*, *Pasteurella*, *Escherichia*, *Pseudomonady*. Bylo ověřeno, že lytické působení zasahuje i *Staphylococcus aureus*, jak ve své kompilaci sumarizují Cunningham et al. (1991). Acker a Ternese (1993) v souhrnu práce poznamenávají, že lysozym inaktivuje i některé viry.

Potvrzení lysozymové antibakteriální aktivity bylo provedeno mnohokrát. Práce Pelegriniho pracoviště (Pelegrini et al., 1990, 1992) uvádějí, že lysozym jako bakte-

ricidní komponenta slepičího bílku působí na gram-pozitivní a gram-negativní bakterie.

Přídavek antibiotik do krmné dávky ovlivňuje tvorbu i aktivitu vytvořeného lysozymu. Vliv některých antibiotik dodaných v krmné dávce (bambermycin 5 a 10 mg/kg a zinc-bacitracin 100 a 200 mg/kg) byl studován na Lohman LSL ve stáří 24–27 týdnů (Bessei et al., 1993). Byl sledován vliv na hmotnost vajec, hmotnost žloutku, obsah proteinů, pH, obsah lysozymu a jeho aktivitu jak v čerstvých vejcích, tak po dvou- a čtyřtýdenním skladování. Signifikantně klesal obsah lysozymu a jeho aktivita proti kontrole, hodnota pH byla při přidavku růstových promotorů vyšší. Vliv se projevil jak na čerstvých, tak na skladovaných vejcích.

Některá mléka produkovaná v Japonsku působí inhibičně na *Bacillus stearothermophilus*, což bylo prokázáno terčovým testem na papíru (paper disk test – PDT). Při studiu příčiny této aktivity bylo zjištěno vedle jiných vztahů, že průměr inhibiční zóny lze korelovat s obsahem laktoferinu a lysozymu v mléce (Okada et al., 1993). Byl vysloven předpoklad, že pozitivní PDT je způsoben zejména laktoferinem a reakce je stimulována lysozymem. Při nefelometrickém sledování suspence *Bacillus stearothermophilus* byl však neúčinnější lysozym, účinek laktoferinu byl nižší.

Při výzkumu listeristatických a listericidních vlastností některých složek bílku (Wang, Shelef, 1991) bylo prokázáno, že 15% přídavek albuminu má listeristatický a vyšší koncentrace listericidní účinek na *Listeria monocytogenes* kmen Scott A a Brie-1 v sójovám bujonu. Zahřátí albuminu na 50–80 °C mělo za následek ztrátu uvedené aktivity. Přídavek lysozymu v koncentraci 1 mg/ml měl významný listericidní účinek s maximem při pH 9. Pro srovnání působil ovomukoid inhibičně v koncentracích vyšších než 2 mg/ml, a to pouze při pH 9. Z pokusu je zřejmé že antilisteriální aktivita ovalbuminu je způsobena lysozymem a ostatní složky ji jenom synergicky zvyšují.

Uvedené poznatky byly rozšířeny další prací (Wang, Shelef, 1991). Cca 15% přídavek albuminu do bujónu sójové tryptikasy byl listeristatický po 24 hodinách zahřívání na 35 °C a vyšší koncentrace byly listericidní. Přídavek železa nebo biotinu neblokoval inhibici. Pokud byl albumin zahřát na 50–80 °C, efekt inhibice vymizel. Přídavek čistého lysozymu v koncentraci nad 1 mg/ml do vývaru vyvolal antilisteriální efekt, zvýšený při pH 9. Ve srovnání s lysozymem byla zjištěna inhibice ovomukoidem ve dvojnásobné koncentraci, a to pouze při pH 9. Odpovídá to konečnému tvrzení, že antilisteriální efekt je vyvolán lysozymem a zvyšován působením ovomukoidu a hodnotou pH blíží se 9.

Výskyt a aplikace

Pod jménem lysozym je v literatuře popisována řada polypeptidických látek. O nich se autoři zmiňují jako o různých typech lysozymu. Jako základní (a rozdílné) byly

charakterizovány typy C a G (K o w a l s k a, 1989), nalezené ve vejcích u dvou plemen kachen. Ve významné publikaci (C o r t o p a s s i, W i l s o n, 1991) jsou rozlišovány dva typy lysozymu (P a M) a tkáně jsou hodnoceny podle jejich poměrného obsahu. Typ C je znám jako husí lysozym a je blízký ostatním lysozymům obratlovců. Vše nasvědčuje tomu, že jako lysozym označované polypeptidy, jimž je společný zejména immunochemický účinek, se vyznačují značným polymorfismem v závislosti např. na plemeni.

Obsah lysozymu ve vaječném albuminu, zjištěný různými metodami, kolísá od 2 do 8 %, což by odpovídalo cca 0,2–0,8 % sušiny bílku. Již před 20 lety publikovali S a u t e r a M o n t o u r e (1972) velmi rozdílné obsahy lysozymu ve vejcích s vysokou (kolem 8 %) a nízkou (do 5 %) koncentrací. Tyto údaje, získané elektroforetickým dělením na acetátové celulóse, však neodpovídají pozdějším údajům o cca 4,5% obsahu lysozymu, získaným např. spektrofotometricky (T e r n e s, 1990; H u n t o n, 1992; B e s s e i et al., 1993; T r z i s k a, C l o s t e r m a n n, 1993).

Lysozym identifikovaný v kravském mléce se vyznačuje vysokou antibakteriální aktivitou vůči orální patogenní mikroflóře, jako jsou *Aktinomyceety*, kmeny *Porphyrromonas*, *Prevotella* a *Fusobacterium*. K u č e r a (1997 – osobní sdělení) ve svých pokusech ale zjistil, že lysozym je na *Aktinomyceety* neúčinný. Zajímavé je, že obsah lysozymu klesá v průběhu 6 laktací na cca 2/3 původní hodnoty. Specifická aktivita enzymu je ale stálá, jeho klesající obsah je v přímém kontrastu se vzrůstem aktivity laktoperoxidasy (T a k a h a s h i et al., 1992). Přítom jeho obsah je o dva řády nižší než v mléce lidském.

Lysozym byl mnohonásobně prokázán např. ve tkáních myši (C o r t o p a s s i, W i l s o n, 1991) a v prsních sekretech žen stížených maligními nálezy v prsou. Sekrety žen bez nálezu a žen s benigními nálezy neobsahovaly lysozym, zatímco sekrety maligně postižených žen obsahovaly lysozym vedle laktoferinu (S a n c h e z et al., 1992). Práce navozuje možnost indikace onemocnění rozbořením sekretů. Dva izoenzymy lysozymu (17 000 a 22 000 D) byly izolovány z kyselého extraktu larev *Musca domestica* na sepharosové koloně a semipreparativní elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (L e m o s et al., 1993) (hodnota pI 7,9–8,2). Chitinásová aktivita takto získaných lysozymů byla šestkrát vyšší než u albuminového lysozymu.

V mléce fen byly nalezeny molekuly vyznačující se aktivitou ekvivalentní lysozymu. Po sekvenční analýze bylo zjištěno, že sekvence aminokyselin obou lysozymů se liší nejméně ve 45 % délky řetězce, ale oba jsou velmi příbuzné jiným stejně účinným polypeptidům jiných savců. Jeden z nich je z 85 % stejný s lysozymem koňského a oslího mléka a stejně jako ony obsahuje vázaný vápenatý ion. Druhý neobsahuje vápník (G r o b l e r et al., 1994). Ve žlutku jiker lososa (*Oncorhynchus kisutch*) byl zjištěn a prozkoumán jiný polypeptid s lysozymovou aktivitou (Y o u s i f et al., 1994). Byl

účinný na *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida* a *Carnobacterium piscicola*. Neúčinný byl na *Micrococcus lysodeikticus* a *Renibacterium salmoninarum*.

Aplikace

Izolované jak čisté, tak jen koncentrované preparáty lysozymu byly a jsou používány v potravinářském průmyslu v širokém měřítku. Využívá se přitom baktericidního působení na substrát, do kterého je lysozym přimíšen. Časté je použití lysozymu pro konzervaci mléka a mléčných výrobků.

Lysozym vaječného bílku byl aplikován do krmné dávky 8–10týdenních selat ve dvou dávkách s rozmezím 14 dnů a byla sledována antibody aktivita (antibody avidity) krevního séra pomocí metody ELISA. Došlo k významnému korelačně odpovídajícímu zvýšení sledované aktivity až do 30 dnů po aplikaci lysozymu (Appleyard et al., 1992).

V důsledku baktericidního působení lysozymu na izolované kmeny mikroorganismů byly činěny pokusy využít ho k potírání infekčních onemocnění, ale i ke snížení krvácivosti (Nakazawa, 1969; Hidaka, 1988).

Poznatky o struktuře molekuly lysozymu a znalost genových sekvencí kódujících jeho tvorbu umožňují sledovat na izolovaných preparátech i jemné diference v jejich složení a postupně se dobrat poznatků o účinných místech molekuly. Do přehledu o vlastnostech a účincích lysozymu pak vlastně nepatří vnášení příslušných genů do jiných DNA s cílem modifikovat odolnost jejich nositelů proti negativnímu působení mikroorganismů.

Plná délka komplementárního DNA klonu odpovídající lysozymu z bílku slepičích vajec byla vnesena do DNA tabáku (Trudel et al., 1992). Lysozymový gen má vlastní oktadekapeptidovou signální molekulu. Z 27 transgeních rostlin tabáku byla tvorba lysozymu zaznamenána u 25 rostlin v koncentraci 30 mg/g hmoty listů tabáku.

Tvorba lysozymu bílku slepičích vajec byla prokázána i u specifických buněk transgeních myší (Yule et al., 1993).

Stanovení

Stanovení obsahu lysozymu v biologickém materiálu s dostatečnou přesností je obtížné. Klasickou metodikou stanovení lysozymu je jeho izolace nebo izolace jeho komplexů s bílkoviny elektroforeticky či jinak s následným hodnocením jeho obsahu pomocí standardního mikroorganismu, nejčastěji *Micrococcus luteus* M. L. Změny v optických vlastnostech suspenze použitého mikroorganismu (za úzkostlivého dodržování růstových podmínek pro všechny vzorky) vyvolané baktericidním působením lysozymu je možné proměřovat (např. nefelometricky) a porovnat s řadou standardů. Na základě řady analogických prací od roku 1970 (např. Chang et al.,

1970) do roku 1990 (např. Imai et al., 1986) vypracovali Trziska a Clostermann (1993) velice přesnou metodiku stanovení lysozymu uvedeným způsobem.

Vhodnou, ale přístrojově náročnou metodu pro stanovení lysozymu přidáného do potravin uvádí Shibata et al (1992). HPLC metoda využívá fluorescence 4-methylumbelliferonu vznikajícího enzymatickou hydrolyzou. Na koloně s reverzní fází [acetonitril – 0,04M glycinový tlumič, pH 12,0 (70 : 30)] jsou odděleny jednotlivé složky. Po extrakci 0,1M natrium fosfátovým tlumičem (pH 6,2) se 2% NaCl je lysozymová aktivita měřena v citrátovém tlumiči (pH 5,2) při 45 °C v průběhu 60 min.

Složitost a někdy přístrojová náročnost uvedených metodik vyvolala mnohé snahy o vypracování jednoduché semikvantitativní metodiky jeho stanovení. Pro tyto účely se zdá být zčásti nadějná cesta, která vychází ze zjištění, že lysozym může působit v jistých vyšších koncentracích (100 µg v 1 ml) chyby ve stanovení β-laktamových antibiotik pomocí mikrobiálních receptortestů (Suhren, Heeschen, 1990; Vermunt et al., 1993). S použitím analogických testerů (Intest, mlékárna Klatovy) bylo orientačně ověřeno, že je možné sledovat antimikrobiální aktivitu vaječného bílku tímto způsobem. Korelaci mezi obsahem lysozymu a pozorovanou reakcí testeru nebylo možné zatím plně prokázat (Vašáková, 1995 – osobní sdělení).

Sumární práce

Z hlediska zemědělského jsou svým významem vedlejší sumární práce. Např. Destefano-Beltran et al. (1993) shrnují použití genů, kódujících lytický působící peptidy (tedy s antimikrobiální aktivitou) pro zvýšení rezistence rostlin vůči chorobám. Práce je rozdělena na několik částí: a) přehled povrchově aktivních peptidů, b) principy zvyšování rostlinné rezistence použitím antibakteriálních genů, c) syntéza antimikrobiálních peptidů a d) tvorba lysozymu bílku slepičího vejce v transgeních rostlinách tabáku.

V rozsáhlé přednášce na sympoziu „Eggs unscrambled: their safety and versatility“ v březnu 1992 shrnul Clarke (1992) význam lysozymu vaječného bílku zejména vzhledem k *Salmonelle*, ostatním zdrojům kontaminace vajec, době skladování a nezávadnosti pokrmů připravovaných z tepelně málo zpracovaných vajec.

Za významný souhrnný referát o lysozymu lze považovat obsáhlou práci, kterou uveřejnil Trziska (1994) a která zahrnuje metodiky izolace, vlastnosti a zejména aplikace v potravinářství.

Literatura

ACKER, L. – TERNES, W.: Eiklar Proteine. In: Ei und Eiprodukte. Hamburg, Berlin, Verlagsbuchhandlung 1993: 250 s.

- APPLEYARD, G. – WILKIE, B. N. – KENNEDY, B. W. – MALLARD, A.: Antibody avidity in Yorkshire pigs of high and low immune response groups. *Veter. Immun. Immunopathol.*, 31, 1992: 229–240.
- BACK, J. F. – OAKENFULL, D. – SMITH, M. B.: Increased thermal stability of protein in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*, 18, 1979: 5191–5196.
- BESSEI, W. – TRZISZKA, T. – KUTRITZ, B. – CLOSTERMANN, G.: Qualitäts-, speziell Lysozym-Veränderungen im Ei auf grund von Lagerdauer und Futterungseinflüssen durch Leistungsförderer. *Arch. Geflügelkunde*, 57, 1993: 166–170.
- CLARKE, D.: Egg as an ingredient in the catering industry. *Food Sci. Technol.*, 6, 1992: 98–100.
- CORTOPASSI, G. A. – WILSON, A. C.: Genetic analysis of a switch in cell specificity of P lysozyme expression in molossinus mice. *Genet. Res.*, 58, 1991: 111–114.
- COTERILL, O. J. – CUNNINGHAM, F. E. – FUNK, E. M.: Effect of chemical additives on yolk contaminated liquid egg white. *Poultry Sci.*, 42, 1963: 283–291.
- CUNNINGHAM, F. E. – COTERILL, O. J.: Effect of centrifuging yolk contaminated liquid egg white on functional performance. *Poultry Sci.*, 42, 1964: 1043–1057.
- CUNNINGHAM, F. E. – PROCTOR, V. A. – GOETSCH, S. J.: Egg-white lysozyme as a food preservative: An overview. *World's Poultry Sci.*, 47, 1991: 141–163.
- DESTEFANO-BELTRAN, L. – NAGPALA, P. G. – CETINER, S. M. – DENNY, T. – JAYNES, J. M. Using genes encoding peptides and proteins to enhance disease resistance in plants. In: CHET, I. (Ed.): *Biotechnology in Plant Disease Control*. New York, Wiley-Liss, Inc. 1993: 175–189.
- GROBLER, J. A. – RAO, K. R. – PERVAIZ, S. – BREW, K. – RAMAKRISHNA-RAO, K.: Sequences of two highly divergent canine type C lysozymes: implications for the evolutionary origins of the lysozyme/alpha-lactalbumin superfamily. *Arch. Biochem. Biophys.*, 313, 1994: 360–366; 32.
- HIDAKA, Y.: Application of lysozyme for medical use. In: *Proc. 18th world's poultry congress*. Nagoya, Japan 1988: 228–231.
- HUNTON, P.: What is an egg? *Poultry Inter.*, 30, 1992(12): 78–82.
- CHANG, P. – POWRIE, W. D. – FENNEMA, O.: Disc gel electrophoresis of protein in native and heat-treatment albumen, yolk and centrifuged whole egg. *J. Food Sci.*, 35, 1970: 774–778.
- IMAI, C. – HOWLAH, A. – SAITO, J.: Storage stability of japanese quail eggs at room temperature. *Poultry Sci.*, 65, 1986: 474–480.
- KANNER, J. – KAREL, M.: Changes in lysozyme due to reactions with peroxidizing methyl linoleate in a dehydrates model system. *J. Agr. Food Chem.*, 24, 1976: 468–472.
- KARPIAK, S.: *Biochemia zwierzat*. RWR i L, Varšava 1986: 94–99.
- KATO, A. – NAKAMURA, R. – SATO, Y.: Studies on changes in storage shell eggs. VII. Changes in the physico-chemical properties of ovomucin solubilized by treatment with mercaptoethanol during storage. *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1971: 351–356.
- KATO, A. – WAKINAGA, N. – MATSUDOMI, N. – KABAYASHI, K.: Changes in lysozyme during egg white thinning. *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1978: 175–176.

- KOWALSKA, M.: Vlacivoci imunologiczne lizozyumu. Med. Weter., 45, 1989: 323–327.
- KUMOSINSKI, T. F. – FARRELL, H. M.: Determination of the global secondary structure of proteins by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Trends Food Sci. Technol., 4, 1993: 169–175.
- LEMO, F. J. A. – RIBEIRO, A. F. – TERRA, W. R.: A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. Insect Biochem. Molec. Biol., 23, 1993: 533–541.
- MAEDA, Y. – YAMAMOTO, T. – HASHIGUCHI, T. – NISHIDA, T. – RAJBHNDARY, H. B.: Polymorphisms of egg white proteins in native chickens in Nepal. Anim. Sci. Technol., 64, 1993: 327–332.
- MATSUDOMI, N. – YAMAMURA, Y. – KOBAYASHI, K.: Aggregation between lysozyme and heat-denatured ovalbumin. Agr. Biol. Chem., 51, 1987: 1811–1817.
- NAKAZAWA, S.: Fundamental study of the antibiotic activity of a bacteriolysing lysozyme effect to use together with aminobenzylpenicillin. J. Antibiotics, 21, 1969: 10–15.
- OKADA, Y. – HARA, F. – NII, N. – HARA, M. – ANZIKI, K. – SIRAI, S. – TAKUWA, K. – NAGAO, S.: Inhibitory activity of lactoferrin and lysozyme in raw cows' milk against *Bacillus stearothermophilus*. J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 46, 1993: 103–107.
- PELEGRINI, A. – GROB, K. – von FELLEBERG, R.: Identification of a bactericidal component active against gram-positive and gram-negative bacteria in commercial ovomucoid and ovoinhibitor as lysozyme. Lett. Appl. Microbiol., 10, 1990: 201–204.
- PELEGRINI, A. – THOMAS, U. – von FELLEBERG, R. – WILD, P.: Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character. J. Bacter., 72, 1992: 180–187.
- PHILIPS, D. C.: The three-dimensional structure of an enzyme molecule. Sci. Am., 215, 1966: 75–80.
- SANCHEZ, L. M. – VIZOSO, F. – DIEZ-ITZA, I. – LOPEZ-OTIN, C.: Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast diseases. Cancer Res., 52, 1992: 95–100.
- SAUTER, E. A. – MONTOURE, J. E.: The relationship of lysozyme content of egg white to volume and stability of foams. J. Food Sci., 37, 1972: 918–920.
- SHIBATA, T. – TSUJI, S. – KOBAYASHI, K. – ASAI, Y. – HONDA, T. – NODA, K. – IWAIDA, M. – MOCHIZUKI, E. – SUGAHARA, O. – ITO, Y.: Determination of lysozyme in various foodstuffs by high performance liquid chromatography with fluorescence detector. Jpn J. Toxicol. Environ. Health, 38, 1992: 437–442.
- SUHREN, G. – HEESCHEN, W.: Zum Nachweis von Lactam-Antibiotika in Milch mit Cite-test, Agardiffusionsverfahren und Mikrobiellem Rezeptor test. Lebensmittelindustrie - Milchwirtschaft., 24, 1990: 784–788.
- TAKAHASHI, N. – EISENHUTH, G. – LEE, I. – SCHACHTELE, C. Ā. – LAIBLE, N. – BINION, S.: Nonspecific antibacterial factors in milk from cows immunized with human oral bacterial pathogens. J. Dairy Sci., 75, 1992: 1810–1820.

TERNES, W.: Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung. Hamburg, Behr's Verlag 1990: 270–271.

TRUDEL, J. – POTVIN, C. – ASSELIN, A.: Expression of active hen egg white lysozyme in transgenic tobacco. *Plant Sci.*, 87, 1992: 55–67.

TRZISKA, T.: Physikochemische Veränderungen des Schaumbildungsvermögens durg Eigelbzugaben zum Eiklar. *Arch. Geflügelk.*, 49, 1985: 195–198.

TRZISZKA, T.: Lysozym – Seine Funktion im Ei (bersichtsreferat). *Archiv Geflügelkunde*, 58, 1994: 49–541.

TRZISKA, T. – CLOSTERMANN, G.: Die Bestimmung der Lysozym-Aktivität als Methode für die Eiqualität-beurteilung. *Arch. Geflügelk.*, 57, 1993: 22–26.

VERMUNT, A. E. M. – STADHOUDERS, J. – LOEFFEN, G. J. M. – BAKKER, R. A. D. – RIKILT, D. L. O.: Improvements of the tube diffusion method for detection of antibiotics and sulfonamides in raw milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 47, 1993: 31–40.

VOET, D. – VOETOVÁ, J. G.: *Biochemie*. Praha, Academia 1995: 401–408.

WANG, C. – SHELEF, L. A.: Factors contributing to antilisterial effects of raw egg albumen. *J. Food Sci.*, 56, 1991: 1251–1254.

YASHITAKE, S. – SHINICHIRO, A.: Use of egg-white lysozyme in food industry. *New Food Ind.*, 19, 1977: 17–23.

YULE, T. D. – BASTEN, A. – ALLEN, P. M.: Hen egg-white lysozyme-specific T cells elicited in hen egg-white lysozyme-transgenic mice retain an imprint of self-tolerance. *J. Immunol.*, 151, 1993: 3057–3069.

YOUSIF, A. N. – ALBRIGHT, L. J. – EVELYN, T. P. T.: *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Dis. Aquatic Organisms*, 19, 1994: 15–19.

Lysozyme – an Interesting Protein

Literary data on lysozyme available in several recent years are summarized in this paper in order to mention the main characteristics, properties and importance of this polypeptide with serious enzymatic effects, which is currently rather neglected in this country. Its content in the egg white is an important criterion of egg stability during their storage.

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Miroslav Jankovský, CSc., Česká zemědělská univerzita v Praze
Agronomická fakulta, 165 21 Praha 6-Suchdol, Česká republika
tel.: 00 420 2 2438 2719, fax: 00 420 2 209 203 12, e-mail: Jankovsky@af.czu.cz

AUTENTICITA OVOCNÝCH NÁPOJŮ A METODY IDENTIFIKACE FALŠOVÁNÍ

Michal VOLDŘICH, Petr PYŠ, Hana OPATOVA

*Vysoká škola chemicko-technologická – Ústav konzervace potravin
a technologie masa, Praha, Česká republika*

Falšování potravinářských výrobků, tj. nedodržení deklarovaného složení, udávání nesprávného původu a stáří apod., je trvalým problémem průmyslové výroby potravin. Snaha ošidit spotřebitele nebo stát (celní předpisy) se táhne od počátku výroby potravin. Falšování postihuje všechny komodity potravinářských výrobků, zejména ty, které jsou vyráběny ve větších objemech, a drahé produkty, u nichž falšování může přinést falšovatelovi určitý zisk. Význam falšování v hlavních komoditách je zřejmý z četnosti publikací v databázi FSTA v letech 1969 až 1996 (tab. I).

I. Podíl jednotlivých komodit na publikacích týkajících se falšování v databázi FSTA v letech 1969–1996

Komodita	[%]	Komodita	[%]
Oleje, tuky	30	Koření, aromata	7
Mléko, mléčné výrobky	25	Med	5
Ovocné nápoje	12	Káva, čaj	2
Maso, masné výrobky	9	Lihoviny	2
Víno, lihoviny	8	Čokoláda, cukrovinky	1

Z uvedených čísel je zřejmé, že ovocné nápoje jsou častým předmětem falšování. Jejich falšování je spojeno s rozvojem průmyslové výroby. První popsána aféra se datuje do roku 1950 v USA. V Tennessee a Georgii se vyráběl 100% pomerančový džus v objemech, které zdaleka neodpovídaly dovozu koncentrátů. Ukázalo se, že nápoj je zcela uměle připravovaný z citranu draselného, chloridu vápenatého, cukru, ovocné dřevě, pomerančové silice, kyseliny citronové, umělých barviv a mandarinkového koncentrátu. Postupně se problém rozšířil do západní Evropy a s rozvojem průmyslové výroby nealkoholických nápojů se dostává i k nám.

Falšování obecně zahrnuje přidavky vody, cukru, dalších levnějších surovin, vydávání levnějších surovin (často i srovnatelného složení a vlastností) za dražší (z vyhlášených oblastí nebo z preferovaných odrůd), deklarování jiné než použité technologie, nedodržení technologického postupu apod. Mezi falšování lze zahrnout také použití

mikrobiologicky narušených dlouho skladovaných surovin, surovin skladovaných za nevyhovujících podmínek nebo vyrobených nesprávným technologickým postupem (Nagy et al., 1988).

Největší objem ovocných nápojů činí produkty z citrusů, zejména pomerančů, proto také nejvíce případů falšování je spojeno s pomerančovými nápoji. Podle některých studií je třetina až polovina citrusových nápojů na evropských trzích nějakým způsobem falšována (Royo Iranzo et al., 1976). Falšovány jsou i další produkty z ovoce a zeleniny.

V případě pomerančů, pomine-li se použití mikrobiologicky narušené suroviny, se můžeme setkat s několika případy falšování:

- Náročnější úprava, obvykle maskující výrazně nižší ovocný podíl, spočívající v přidavku silice, β -karotenu, přikyselení, oslazení (invertním sirupem) až po úpravu obsahu kationtů např. síránem draselným apod.
- Jednoduché snížení obsahu ovocného podílu naředěním a přislazením.
- Vyšší naředění vodou (přímo lisovaná šťáva by neměla mít RF pod 10 °Brix, v případě rekonstituované šťávy z koncentráту u nás dosud platné normy připouštějí minimální refrakci 10 °Brix, podle evropských předpisů to je ale 11,2 °Brix).
- Přídavek levnějšího koncentráту (např. koncentráту nebo šťávy z bílého hroznového vína).

Za způsob falšování lze považovat také použití koncentráту obsahujícího „pulp-wash“ (koncentrát vyrobený z extrahovaných výlisků).

U jablek se také objevily případy umělého koncentráту a šťávy – roztoku sacharosy, invertované sacharosy, dusičnanu draselného, jablečného aroma, kyseliny jablečné a kuléru. Častým případem falšování kromě naředění vodou, maskování nižšího ovocného podílu cukrem a kyselinami a dalšími přísadami je také přídavek méně stabilního hruškového koncentráту, případně zpracování jablek s podílem hrušek. Z pohledu výrobce je výhodné mixování různých surovin, např. přídavek levnějšího jablečného koncentráту do koncentráतů nebo nápojů z barevného ovoce.

Postup identifikace falšování může být v zásadě dvojitý. U produktu jsou analyzována vybraná kritéria, jejichž hodnoty se porovnávají s databází, autentický produkt musí vyhovovat ve sledovaných parametrech, které jsou pro každý výrobek tabelovány, např. formou rozsahu hodnot a komentáře k interpretaci. Na podobném principu je také posuzován původ vzorků na základě analýzy izotopů. Druhým přístupem může být podezření na určitý způsob falšování a volba takových postupů, které přijatou hypotézu potvrdí. Častější je první uvedený způsob. Asociace výrobců šťáv a nektarů (Anonym, 1993) při EEC, podobně i německý systém RSK – Richtwert, Schwankungsbreite, Kennzahl (Anonym, 1987) uvádějí pro každý druh šťávy (koncentráту) přehled sledovaných parametrů a rozsahy hodnot, které musí produkt splnit, spolu s doplňujícími informacemi.

Další hledisko rozdělení metod může být podle principu použitého postupu; metody jsou sumární, např. spektrální, kterými je posuzována nějaká sumární vlastnost nebo je zjišťován obsah určité složky. Následující odstavce uvádějí přehled metod, resp. sledovaných vlastností nebo analytů.

Pomerančová šťáva je podle definice Směrnice EEC získána mechanickými postupy ze zralých zdravých plodů, ošetřena fyzikálními postupy; dále platí, že:

- pomerančová šťáva je získána z druhu *Citrus sinensis*;
- ovocná dřeň smí být dodána zpět do šťávy získané z koncentráту, a to v přirozeném množství (tj. v množství, které je přirozené pro normální šťávu);
- okyselení, odkyselení a odstranění hořkých látek není dovoleno.

Grapefruitová šťáva je podle definice Směrnice EEC získána mechanickými postupy ze zralých zdravých plodů, ošetřena fyzikálními postupy; předpokládá se, že:

- grapefruitová šťáva je získána z druhu *Citrus paradisi*;
- ovocná dřeň smí být dodána zpět do šťávy získané z koncentráту, a to v přirozeném množství (tj. v množství, které je přirozené pro normální šťávu);
- okyselení, odkyselení a odstranění hořkých látek není dovoleno.

Jablečná šťáva je podle definice Směrnice EEC získána ze zdravého, zralého ovoce. Může být ošetřena fyzikálními postupy a nebo difúzními postupy, a to za předpokladu, že takto získaná šťáva vykazuje stejné organoleptické a analytické vlastnosti jako výrobek získaný mechanickými postupy; další požadavky jsou:

- jablečná šťáva je získána z druhu *Pyrus malus*;
- jablečná šťáva je přirozeně zakalená nebo čistá;
- v určitých zemích je povoleno okyselení přidávkem kyseliny citronové až do 3 g/l, a to podle národních předpisů a za řádného označení;
- odstranění kyselin není dovoleno.

Metody používané k identifikaci falšování, parametry určující autenticitu šťáv a koncentrátů

Relativní hustota a obsah refraktometrické sušiny

Používají se jako pomocné ukazatele. Indikují nejprimitivnější způsob falšování – nadměrné naředění při rekonstituci šťáv z koncentrátů. Hodnota relativní hustoty je získána z výsledků přírodní (ručně vymačkané) šťávy (1,045).

UV-VIS spektroskopie

Ve starších pracích je popsán způsob uzanční přípravy vzorku – oddělení nerozpustného podílu. Naměřené UV-VIS spektrum je použitelné k identifikaci surovin ve směsi, k charakterizaci ovoce, s omezeními i k určení původu. Metoda se příliš

neosvědčila, je závislá na úpravě vzorku a vyžaduje širokou databázi pro interpretaci výsledků. Moderní systémy (RSK, AIJN atd.) ji nezahrnují.

NIR spektroskopie

Spektroskopie v blízké infračervené oblasti může být perspektivní pro identifikaci falšování. Na rozdíl od posuzování průběhu spektra jako v případě UV/VIS jsou na základě paralelních chemických analýz hledány korelace mezi určitými oblastmi spektra a chemickým složením, resp. falšujícími přísadami. Metoda teprve uplatnění nachází, z dosud publikovaných výsledků je zřejmé, že by mohla být použitelná minimálně pro rychlý screening vzorků, kterým by byly vymezeny podezřelé vzorky k podrobnější chemické analýze (E v a n s et al., 1993).

Izotopový poměr

Při posuzování pravosti a častěji při potvrzení původu nachází uplatnění analýza izotopů. Sledované izotopy, resp. poměry izotopů jsou: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ a D/H. Izotopy se běžně v určitých koncentracích nacházejí v prostředí, jejich koncentrace je dána místem, u izotopů kyslíku a vodíku také složením vody využívané při metabolických pochodech, v případě izotopů uhlíku také typem metabolického cyklu. U rostlin existují dva typy metabolických cyklů: C3-cyklus a C4-cyklus. V rostlinách metabolizujících podle C3- cyklu je více fixován atmosférický oxid uhličitý, což se projeví vyšším obsahem izotopu ^{13}C . Konečným metabolitem C3-cyklu je kyselina 3-fosfoglycerová. V C4-cyklu se váže pouze malé množství CO_2 a konečným metabolitem je čtyřuhlíkatá kyselina oxaloctová. Podle analýzy poměrů izotopu uhlíku lze identifikovat přísadky vody, snížení ovocného podílu, přísadek produktů rostlin druhé skupiny a omezení původ surovin. Pomeranče, jablka a další suroviny pro výrobu šťáv mají obvyklejší metabolismus C-3, cereálie (kukuřice) a cukrová třtina metabolismus C-4 (Nissenbaum, Feld, 1974). Přísadek třtinového cukru, hydrolyzátů cereálních škrobů apod. do nápojů může být detekován na základě poměru izotopů uhlíku.

Izotop kyslíku ^{18}O se vyskytuje v nízkých množstvích v prostředí, jeho obsah je vázán zejména na spodní vodu. V rostlinách je akumulován v závislosti na lokalitě, intenzitě dýchání pletiv a průběhu odpařování vody. Použití poměru $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ je důležité pro rozlišení čerstvé šťávy od šťávy rekonstituované a pro zjištění toho, zda byla šťáva získána zcela uměle či nikoliv (Brause et al., 1979). Obecně je možné podle poměru izotopů kyslíku zjistit snížení ovocného podílu, přísadek cukru a do určité míry spolu s dalšími izotopy také původ suroviny.

Poměr izotopů deuterium/vodík má podobný význam jako kyslík, vyšší obsah deuteria je ve spodních vodách, jeho kumulace v rostlinách je dána lokalitou a vlastnostmi rostlinného pletiva. Poměr izotopů indikuje snížení ovocného podílu, přísadek

vody, případně původ. Na základě analýzy izotopů vodíku je možné odhalit přídavek řepného cukru do ovocné šťávy. Je však třeba nechat cukr zkvasit. Potom se proměří obsah deuteria v etanolu, který vznikne zkvašením, případně intramolekulární rozložení deuteria v etanolu.

Ke stanovení poměru izotopů se využívá hmotnostní spektrometrie (SCIRA – Stable Carbon Isotope Ratio Analysis) a NMR (SNIF-NMR Site Specific Natural Isotope Fractionation measured by NMR). Postupy vyžadují poměrně náročnou přípravu vzorku, spálení, případně zkvašení a izolaci etanolu. K interpretaci výsledků je potřebná databáze, velmi zkušená obsluha a drahé přístroje. U nás se analýzou izotopů zabývají v laboratořích Celní správy.

Analýza organických kyselin

Organické kyseliny jsou důležitým parametrem při identifikaci falšování ovocných šťáv. Při snižování ovocného podílu přislazením je potřeba vyrovnat také kyselou chuť a proto je velmi často přidávána kyselina. Při míchání různých koncentrátů může být falšování odhaleno v důsledku rozdílného obsahu kyselin v jednotlivých surovinách.

Kromě potvrzení falšování na základě nalezení rozdílných než uváděných hodnot pro jednotlivé druhy šťáv může složení kyselin indikovat také způsob falšování. Nález kyseliny citronové v jablečném nápoji indikuje přídavek kyseliny citronové, hrušek nebo hruškového koncentrátu. Při okyselení jablečného nápoje syntetickou kyselinou jablečnou bude produkt obsahovat D-jablečnou kyselinu, která se v ovoci nevyskytuje. Dalším důkazem přídavku kyseliny jablečné může být nález stop kyseliny fumarové, která je častou příměsí v syntetické kyselině jablečné.

V případě pomerančového koncentrátu nebo šťávy je indikací poměr kyseliny citronové a isocitronové (který je např. podle AIJN max. 130). Pravá šťáva obsahuje určitý podíl kyseliny isocitronové, který se sniží v případě okyselení kyselinou citrónovou.

Přídavek koncentrátu nebo šťávy z bílého hroznového vína lze dokázat nálezem kyseliny vinné, která je obsažena v hroznovém víně a v ostatních surovinách se nevyskytuje.

Jedním ze sledovaných parametrů je také biogenní kyselina mléčná, jejíž nález ve výrobku indikuje mikrobiální narušení suroviny.

Analýza cukrů

Cukry jsou nejčastěji využívány jako analytický parametr k indikaci falšování, jejich přídavek patří mezi nejjednodušší případy falšování. Nápoje obsahují zejména sacharosu, glukosu a fruktosu v různých poměrech. V případě ne velmi komplikovaného falšování není problém přídavek cukrů upravit v požadovaném poměru. Jablečná šťáva se vyznačuje převládající fruktosou (podle AIJN je poměr glukosa/fruktosa 0,3 až 0,5),

požadovaný poměr lze dosáhnout přidavkem fruktosového sirupu. Ještě snazší je to v případě citrusových šťáv, ve kterých je glukosa a fruktosa zastoupena ve shodné koncentraci, správný poměr se dosáhne přidavkem určitého podílu invertované sacharosy. Jen na základě analýzy cukrů nelze proto dělat závěry o pravosti nápoje, ale jednodušší způsoby falšování (doslazení sacharosou, případně přidavek jiného koncentrátu) analýza cukrů odhalí. Nízký obsah sacharosy může být také způsoben její inverzí. Nízký poměr glukosa/fruktosa může indikovat mikrobiální degradaci glukosy.

V případě zmíněných způsobů přidavků cukrů lze falšování odhalit podle snížených parametrů vztahujících se k ovocnému podílu (draslík, formolové číslo apod.), nebo přesněji analýzou izotopů.

Vedle složení cukrů jsou pro identifikaci falšování významné také cukrům příbuzné látky (sorbitol) a degradační produkty cukrů. Sorbitol je obsažen ve šťávě jablek (podle AIJN 2,5–7 g/l), merunek (1,5–10 g/l), největší obsah mají hrušky (10–25 g/l). Sorbitol může indikovat přidavek jablečného nebo hruškového koncentrátu např. do nápojů z barevného ovoce. Vyšší obsah sorbitolu v jablečném koncentrátu nebo šťávě svědčí o přidavku hrušek. Přidavek fruktosového sirupu nebo jiných kyselých hydrolyzátů polysacharidů může být doprovázen zvýšením obsahu degradačních produktů cukrů, zejména 5-hydroxymethyl-2-furankarbaldehydu (hydroxymethylfurfuralu – HMF), který vzniká při výrobě.

Aminosloučeniny, aminokyseliny a související vlastnosti

Aminosloučeniny jsou využívány k hodnocení obsahu ovocného podílu. Pravděpodobně nejjednodušší test je stanovení formolového čísla, tj. uzančným způsobem stanovené množství α -aminosloučenin vyjádřené v ml 0,1M NaOH na 100 ml šťávy. Hodnota formolového čísla závisí na stupni zralosti, odrůdě a také na podmínkách zpracování ovoce. Čím je obecně vyšší rozrušení buněk, tím více aminosloučenin šťáva obsahuje. Celý pomeranč má vyšší formolovou hodnotu, která se zvyšuje s množstvím přidávané kůry, zatímco formolová hodnota filtrované šťávy zůstává konstantní.

Hodnotu formolového čísla lze zvýšit přidavkem amoniaku nebo amonných solí. Tento přidavek je detekovatelný stanovením upravené hodnoty formolového čísla po odstranění amoniaku. Pokud je upravené formolové číslo nižší než 90 % původní hodnoty, lze vyvodit závěr o přidavku amoniaku. Dalším způsobem zvýšení hodnoty formolového čísla je přidavek etanolaminu – etanolamin je možné stanovit při analýze složení aminokyselin na aminoanalyzátorech. Nález vyššího množství než tabelovaného pro přirozený výskyt indikuje maskování falšování.

Druhým instrumentálně nenáročným stanovením je obsah prolinu – spektrofotometricky zjištěná hodnota po reakci extraktu šťávy z ninhydrinem. Spolu s formolovým číslem je často využívána v různých empirických vzorcích pro výpočet obsahu ovocného podílu. Existuje korelace mezi koncentrací prolinu a formolovým číslem; hodnota

korelačního koeficientu je dalším kritériem pro posouzení pomerančových šťáv. Koncentrace prolinu je extrémně závislá na stupni zralosti, odrůdě a zemi původu. Brazílské pomerančové šťávy vyrobené ze sklizně brzy dozrávajících plodů mohou mít obsah prolinu pod 575 mg/l, zatímco šťávy vyrobené z ovoce z pozdní sklizně mohou dosáhnout přes 1 000 mg/l. Obecně platí pro obsah prolinu totéž co pro ostatní aminosloučeniny.

Systém AIJN i RSK zahrnuje také instrumentálně náročnější analýzy spektra aminokyselin. Kromě posouzení pravosti porovnáním obsahu jednotlivých aminokyselin s tabelovanými rozsahy hodnot je možné usuzovat také na způsob falšování a v některých případech také na odrůdu nebo původ suroviny. Maskovat falšování přidávkem směsi aminokyselin by bylo poměrně drahé. Pokud by takový případ nastal, zřejmě by byly použity syntetické aminokyseliny, obvykle racemické směsi. Přirozená ovocná šťáva obsahuje L-aminokyseliny, k detekci přídavků racemických aminokyselin je využíváno stanovení D-aminokyselin (Ooghe et al., 1984; Cohen, Fuchs, 1984).

Např. odrůda Kalifornia Navel vykazuje poměrně vysoké formolové číslo a koresponduje s vysokou koncentrací aminokyselin, nicméně obsah kyseliny asparagové je nižší než specifická minimální hodnota. Obsah této kyseliny je součástí poměru (prolin + arginin)/(kyselina asparagová + asparagin). Při koncentračních změnách způsobených zralostí a sezonností je tento poměr čtyř aminokyselin lepším kritériem než absolutní koncentrace. Poměr pro pomeranče a mandarinky je asi 3, pro grapefruity 1 a pro citrony 0,3.

K charakterizaci pomerančových šťáv lze použít součet všech volných aminokyselin a součet serinu, prolinu, γ -aminomáselné kyseliny a argininu spolu s poměry těchto sumárních obsahů.

Speciální důraz je kladen na glycin, který je v citrusových šťávách přítomen ve velmi nízkých hladinách, ale relativně hojně se vyskytuje v proteinových hydrolyzátech.

Popel, makroelementy, vybrané anionty a další příbuzné parametry

Obsah popela patří mezi klasické analytické parametry a používá se také při identifikaci falšování (jeho hodnoty jsou vedeny v tabulkách AIJN i RSK). Vedle obsahu popela je využíváno také stanovení obsahu makroelementů: draslíku, sodíku, hořčíku, vápníku, celkového fosforu, dusičnanů a síranů, případně také arsenu a těžkých kovů (McHard et al., 1979). Obsah minerálních látek ve šťávě souvisí s ovocným podílem. Podle vybraných kritérií lze usuzovat na druh nebo odrůdu. Například pomerančová šťáva z pomerančů z Izraele a Španělska má nižší obsah popela než šťáva brazilských pomerančů. Pro podobné rozlišení zdroje může být použito stanovení obsahu jednotlivých minerálií. Některé anorganické složky vypovídají o použité technologii nebo kvalitě suroviny. Například příliš vysoký tlak lisování nebo přídavek pulp-wash je spojen s vyšším obsahem vápníku. Vyšší obsah síranů může nasvědčovat použití

nevhodné vody při rekonstituci šťávy nebo konzervaci siričitany v některé etapě výroby.

Vybrané parametry charakteristické pro citrusy

Flavonoidní glykosidy vyjádřené jako hesperidin nebo naringin

Důležitým znakem citrusových šťáv je obsah flavonoidních glykosidů. Metody kontroly pravosti zahrnují sumární metodu stanovení flavonoidních glykosidů jako hesperidin. Průměrná hodnota takto stanovené koncentrace flavonoidních glykosidů je asi 800 mg/l. U některých odrůd (např. Hamlin) a země původu (např. Itálie) může být maximální hodnota (1 000 mg/l) mírně překročena, zejména u velmi měkkého ovoce. Koncentrace se určí spektrometrickým stanovením žlutých chalkonů po uzančení úpravě a alkalizaci šťávy. Stanovení jednotlivých flavonoidů (naringin, hesperidin, hesperidinu a naringinu) se provádí také chromatograficky. Obsah hesperidinu určený pomocí HPLC je přirozeně nižší než hodnota určená metodou podle Davise.

Vyšší obsah flavonoidů je indikací přídavku pulp-wash nebo použití vyššího tlaku při lisování. Zjištěné hodnoty mohou také posloužit k detekci míchání jiných druhů ovoce, např. vyšší množství naringinu v pomerančové šťávě svědčí o přídavku grapefruitů.

Pektinové látky

Pektinové látky – sumární obsah kyseliny galakturonové, případně obsah rozpustných a nerozpustných pektinových látek – indikují zejména použitou technologii lisování. Šťávy s přídavkem pulp-wash obsahují více pektinových látek. Maximální obsah 500 mg/l ve vodě rozpustných pektinů je zřídka překročen. Rozdíl v obsahu rozpustných pektinových látek (rozpustné ve vodě a šťavelanu nebo v zásaditém prostředí) může být způsoben odrůdou, stupněm zralosti a použitou technologií. Uváděné maximální hodnoty nejsou překračovány u surových nezpracovaných šťáv, pokud obsah dřeně není vyšší než 10 %.

Obsah nerozpustného podílu

K posouzení technologie, případně k potvrzení přídavku pulp-wash slouží různé uzanční metody stanovení nerozpustného podílu v citrusových šťávách, např. bilance po odstředění při 370 g. Čerstvě vylisovaná šťáva má 10 až 16 % dřeně, dalším zpracováním podíl klesá. Obsah dřeně koreluje z pektinovými látkami, flavonoidy, vápníkem a dalšími parametry používanými pro detekci přídavku pulp-wash.

Karotenoidy a jejich estery

Karotenoidní barviva jsou také mírou ovocného podílu ve šťávě, ředěním nebo přídavku cukrů a kyselin se koncentrace barviv ve šťávě snižuje. Kromě sumárního stanovení barviv se používá také stanovení jednotlivých barviv. Falšování může být maskováno přídavkem β -karotenu, jeho koncentrace vyšší než 5 % u pomeranče nasvědčuje přídavku barviva nebo zpracování jiných druhů citrusů.

Parametry indikující nedodržení technologie

Do falšování se řadí také použití narušené suroviny nebo nedodržení technologického postupu. Mezi indikátory mikrobiologického narušení patří již zmíněná kyselina mléčná, jejíž obsah je např. v systému AIJN sledován. Dalším sledovaným biogenním produktem je etanol. Zejména v případě jablečné šťávy může být významným znakem obsah patulinu, jeho nálezy ve šťávě dokazuje zpracování určitého podílu plesnivých jablek.

Z indikátorů dodržení správné technologie zpracování to je zejména obsah 5-hydroxymethyl-2-furankarbaldehydu (hydroxymethylfurfuralu – HMF), který vzniká kyselinou dehydratací hexos při záhřevu nebo dlouhodobém skladování. Jeho maximální přípustný obsah je 20 mg/l, vyšší nálezy svědčí o chybné technologii nebo stáří produktu. Podobně lze využít také 2-furankarbaldehyd (furfural), vznikající z pentos a kyseliny askorbové nebo inverzí sacharosy. Inverze sacharosy může způsobit změny v poměrech cukrů.

Analytické metody

Systémy posuzování pravosti jsou vázány na normativní metody stanovení jednotlivých parametrů, které vycházejí např. z metodik AOAC, ISO norem nebo evropských norem. Postupně probíhá zavádění zejména evropských norem i u nás. Je-li používána jiná alternativní metoda, je nezbytné ji minimálně porovnat se standardní metodou.

Použití standardních uzančních postupů je nezbytné zejména u parametrů, u kterých zjištěná hodnota závisí na úpravě vzorků a postupu stanovení. To je např. stanovení flavonoidů podle Davise, stanovení formolového čísla, nerozpustného podílu (dřeně) apod. Stanovení jednotlivých složek je možné provést různými způsoby. Velmi výhodné metody, z nichž řada je zahrnuta v ISO a evropských normách, jsou enzymové metody stanovení používané pro cukry, kyseliny, etanol apod. Jejich výhodou jsou nízké instrumentální nároky, koncovka je většinou spektrometrická ve viditelné oblasti. Další oblastí jejich využití je rozlišení D- a L-forem optických izomerů, které je jinými postupy (např. chromatografickými) podstatně náročnější. Celá škála testovaných parametrů, tak jak jsou uvedeny v systémech AIJN nebo RSK, bude sledována v kontrolních laboratořích, výrobce by měl mít možnost zadat si analýzu vstupní suroviny při podezření. V některých případech by mohlo být žádoucí některé analýzy provádět v provozních laboratořích větších podniků.

L i t e r a t u r a

ANONYM: VdF Association of the German Fruit Juice Industry. RSK Values, the Complete Manual, Guide Values and Ranges of Specific Numbers, Including the Revised Methods of Analysis. Verlag Flüssiges Obst GmbH 1987.

ANONYM: Codex Alimentarius Commission: Joint FAO/WHO Food Standards Programme of Fruit Juices and Related Products. Alinorm, 6, 1992: 3-6.

ANONYM: Association of the Industry of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the EEC (AIJN): Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices. Brussels, A. I. J. N. 1993.

BRAUSE, A. R. – RATEMAN, J. M. – PETRUS, D. R. – DONER, L. W.: Verification of authenticity of orange juice. JAOAC, 67, 1984: 535–539.

COHEN, E. – FUCHS, C.: Use of aminoacid standards for the detection of dilution and adulteration of fruit juice: statistical analyses of Israeli citrus juice. Fluess. Obst, 1984: 185–188.

EVANS, D. G. – LEGRAND, A. – JEWELL, K. – SCOTTER, C. N. G.: Use of high-order principal components in NIR spectroscopy. J. Near Infrared Spectroscopy, 1, 1993: 209–219.

McHARD, J. A. – FOULK, S. J. – WINEFORDNER, J. D.: Evaluation of selectivity in atomic-absorption and atomic-emission spectrometry. J. Agric. Food Chem., 27, 1979: 1326.

NAGY, S. – ATTAWAY, J. A. – RHODES, M. E.: Adulteration of Fruit Juice Beverages. New York, Basel, Marcel Dekker Inc. 1988.

NISSENBAUM, A. – FELD, M.: Rapid preparation of orange juice and other biological fluids for natural oxygen-18 and deuterium analysis. Lebensm. Wiss. Technol., 7, 1974: 152.

OOGHE, W. – KASTELEYN, H. – TEMMERMAN, I. – SANDRA, P.: Aminoacid enantiomer separation for the detection of adulteration in fruit juices. HRC CC. J. High Resolut. Chromatogr. Commun, 7, 1984, 284–285.

ROYO IRANZO, J. – ARANDA, A. – PERIS TORAN, J.: Internal quality of spanish oranges. Rev. Agroquim. Technol. Aliment., 16, 1976: 241.

Authenticity of fruit beverages, detection of falsification

Fruit beverages with higher content are very often adulterated. The falsification covers the use of other than declared raw materials and technological procedures, lowering of fruit content (addition of sugars, acids, dilution, coloring, masking of falsification, etc.). The methods of authenticity evaluation are based on the analyses of selected analytes, the obtained values are compared with tabulated data (AIJN, RSK, etc.).

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Michal Voldřich, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav konzervace potravin a technologie masa, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika tel.: 00 420 2 2435 3012, fax: 00 420 2 311 99 90, e-mail: Michal.Voldrich@vscht.cz

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Konference a workshop

„Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods during Production, Storage and Distribution“

(Praha, 23.–25. června 1997)

Konference se konala pod záštitou Mezinárodního institutu pro chlazení se sídlem v Paříži a Evropské komise, sekce DGXII. Konferenci organizovalo Centrum potravinářských technologií a techniky v čele s Výzkumným ústavem potravinářským Praha, Fakultou strojní ČVUT a Fakultou potravinářské a biochemické technologie VŠCHT Praha. Význam konference podtrhla účast zástupců všech zúčastněných organizací na jednání konference.

Konference byla vyvrcholením tříletého projektu stejného názvu, jehož koordinátorem je Dr. Paul Nesvada z Univerzity Roberta Gordona v Aberdeenu. Projekt byl financován z prostředků Evropské komise v rámci programu PECO (později COPERNICUS). Cílem projektu bylo vytvoření souboru programů, které budou sloužit k řešení problematiky stanovení teplot v kusovitých potravinách během výrobních procesů, při skladování nebo distribuci. Důraz byl kladen na jednoduchost řešení, rozumnou přesnost predikce teplotní historie a možnost použití osobních počítačů třídy PC. Proto stěžejním obsahem konference bylo představení této sady programů, resp. programů řešících jednotlivé případové studie.

Jde o program COSTHERM2, vylepšený řešiteli projektu tak, že lze predikovat tepelné vlastnosti potravin (entalpie, měrná tepelná kapacita, tepelná a teplotní vodivost, množství vymražené vody) v závislosti na složení potravin jako funkce teploty. Kromě toho lze nyní stanovit klíčovou veličinu bod počátku mrznutí na základě znalosti obsahu minerálních látek a složení cukrů, přičemž je nabízena menší databáze bodů počátku mrznutí typických potravin. Tepelná vodivost potravin byla vylepšena tak, že obsahuje možnost volit kombinovaný model (smíšený serio-paralelní), který je mnohem realističtější popisem tepelné vodivosti potravin. U potravin obsahujících vyšší obsah tuků je možné zadat rozsah tání a tavení a modelovat tak tyto děje alespoň jednoduchým způsobem.

Dalším stěžejním programem je SURFHEAT. Jde o prediktivní databázi cca 400 prediktivních rovnic pro stanovení součinitele přestupu tepla z média do potravin. Program obsahuje cca 40 typických geometrií, pro které byly nalezeny kritériální rovnice. Z těchto rovnic pro daný druh media a rychlost jeho proudění program stanoví funkci součinitele přestupu tepla. Tato hodnota je spolu s údaji o tepelných vlastnostech dané potraviny vstupním parametrem dalšího programu s názvem

HEATSOLV, který je určen již k vlastnímu řešení vedení tepla potravinou. Jeho výstupem je teplotní historie ve zvolených uzlových bodech potravin. Program umožňuje řešit jednoduché tvary (deska, válec, koule) nebo složité tvary na tyto jednoduché převádí. Cílem je stanovení teplotní historie dané potravin v daném prostředí.

Jako příkladové studie a programy byly prezentovány MAIPROF (řešení zásilek chlazených potravin poštou), VACOOOL (model procesu vakuového chlazení kapalin) a MWHEAT (model mikrovlnného ohřevu potravin deskovitého tvaru).

Kromě těchto programů byl představen program BERTIX a BAKTIX (TNO Apeldoorn), který řeší přestup tepla a hmoty při chlazení drůbeže a pečení různých druhů pečiva.

Velmi hodnotnou přednášku přednesl prof. Nicolai, z Katolické univerzity v Lovani. Řešili numericky obtížné problémy přestupu tepla a hmoty při obtékání potravin. Byl uveden příklad řešení pečení hamburgerů nebo přípravy jídel metodou Sous vide.

Po ukončení konference bude vydán sborník plných textů příspěvků (v době konání konference byl k dispozici sborník abstrakt).

Konference se zúčastnilo celkem 53 účastníků z 19 států (Belgie, Bulharsko, Česká republika, Francie, Velká Británie, Maďarsko, Polsko, Čína, Itálie, Japonsko, Nizozemsko, Norsko, Ruská federace, Španělsko, Slovensko, Švédsko, Turecko, Portugalsko a USA). Celkem bylo prezentováno 42 příspěvků (19 přednášek a 23 posterů). Mezi účastníky konference byli též pracovníci z průmyslu (Danone, ČKD, Thermoking, Gemini data loggers, Novasina, Likospol). Oficiálními sponzory se staly IIR, Thermoking a ČKD. Své produkty prezentovala firma Gemini dataloggers, VÚPP a Novasina. Dr. Mike Morley předvedl speciální čidlo pro měření tepelné vodivosti potravin.

Ke spokojenosti všech účastníků byl připraven poměrně bohatý kulturní program (Laterna Magica, prohlídka Prahy, výlet na Konopiště a do Kutné Hory). Organizaci pod vedením VÚPP bezchybně zajišťovala Travel Agency Carolina.

*Za organizační výbor
Ing. Milan Houška, CSc.*

XXVIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin

Ve dnech 26.–28. 5. 1997 se ve Skalském dvoře konalo XXVIII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin pořádáné Odbornou skupinou pro potravinářskou a agrikulturní chemii České společnosti chemické. Letošního symposia se zúčastnilo 107 odborníků z České republiky a Slovenska a bylo na něm prezentováno 35 ústních sdělení a 40 posterů.

Úvodní blok referátů byl věnován problematice falšování potravinářských surovin a potravin. Falšování postihuje všechny komodity potravinářských výrobků, zejména však ty, které se vyrábějí ve větších objemech a jsou drahé. Podle počtu citací databáze FSTA se otázka porušení autenticity produktů řeší zejména u olejů, tuků, mléka a mléčných výrobků, ovocných nápojů, masa a masných výrobků, vína, koření a dalších potravinářských výrobků a surovin. Skupina referátů se týkala detekce falšování ovocných šťáv a koncentrátů. V této oblasti se uplatňuje především analýza cukrů, analýza organických kyselin, barviv a flavonoidních látek. Používají se metody HPLC, izotachoforéza, enzymové metody, izotopová analýza a NIR metody. Autenticitu některých potravin lze prokázat též za využití trichromatické kolorimetrie. Problematika pravosti alkoholických nápojů zahrnuje především prokázání původu použitého lihu, aromatických látek a barviv. U vín je aktuální průkaz přidavku cukru do moštu. Pro řešení tohoto problému se využívá izotopová analýza. V případě falšování masa a masných výrobků dochází nejčastěji k záměně druhu masa a živočišné a rostlinné bílkoviny. Analyty, pomocí kterých lze identifikovat druhový původ masa, jsou především proteiny, nukleové kyseliny a tuky.

Další skupina referátů se věnovala potravinové problematice z obecnějšího hlediska. Jednalo se o referáty zaměřené na současný stav a perspektivu klasifikace potravin, na definici funkčních potravin a dále na vývoj legislativy některých potravinových skupin. Pozornost byla věnována modernizaci systému zajištění zdravotní nezávadnosti potravin v průběhu jejich výroby, který je součástí přijatého zákona o potravinách a je uváděn pod označením HACCP.

Několik sdělení se soustředilo na charakterizaci a možnost uplatnění nových nutričně zajímavých surovin. Bylo referováno o parametrech nutriční kvality zrna bezpluchých ječmenů, o hodnocení mikrobiologické, nutriční a senzorické jakosti amarantových výrobků, o amarantových škrebech. Pupalkový olej, který je zdrojem γ -linolenové kyseliny, vykazuje i mírné antimikrobiální vlastnosti při aplikaci do mléčných jogurtů. Stilbenoly, přirozené složky hroznů a vín, jsou další zajímavé ingredience s chemoprotektivními účinky. Kromě nutričních charakteristik byly uvedeny např. fyzikálně-chemické vlastnosti přeesterifikovaných tuků a reologické vlastnosti mléčných jogurtů.

Problematika aditivních látek je stále aktuální a v programu symposia jí bylo věnováno několik referátů. Přirozené antioxidanty obsažené v šalvěji a v rozmarýnu vykazují silný antioxidační účinek pro rostlinné oleje s vysokým obsahem výše nenasycených mastných kyselin a jsou vhodné i za podmínek smažení. Rovněž antokyani- nová složka černého bezu a černého rybízu může hrát významnou úlohu při ochraně

lipidů před oxidací. K prodloužení údržnosti masných výrobků bylo s úspěchem ověřeno užití bakteriocinů a mléčnanů. Dále bylo referováno o zatím nevyužívaném zdroji aditivních látek – odpadu při zpracování rajčat, z kterého lze získat olej a koncentrát barviv, bílkovin a vlákniny. Aplikace perspektivní aditivní látky hořké chuti (oktaacetylsacharosu) byla ověřována u nealkoholických nápojů. Přirozené inhibitory klíčení na bázi karvonu z kmínové silice se osvědčily při skladování brambor.

Do oblasti dietních výrobků směřovaly referáty týkající se např. optimalizace složení piškotů vhodných při celiakii nebo aplikace nízkenergetických náhrad tuku do potravin, ale i sledování rozdílů ve složení mastných kyselin a cholesterolu ve vejcích z velkochovů a malochovů.

Nedílnou součástí programu byly již tradičně práce zabývající se interakcemi složek potravin. Jednalo se např. o interakce směsi aromat s β -laktoglobulinem, dále o studium kinetiky reakce lipoxygenasy s kyselinou linolovou a možnosti inhibice této reakce. Prezentovány byly dále výsledky sledování degradace prekursoru sirných látek cibule – isoalliinu, reakce allylisothiokyanátu s aminokyselinami a peptidy, degradace glukobrassicinu izolovaného z růžičkové kapusty.

Program sympozia byl z velké části zaměřen na metody hodnocení potravin z hlediska nutričního, senzoryckého a hygienického. Část referátů se tedy zabývala analytickými aplikacemi chromatografických, spektrofotometrických, bioafinitních a senzoryckých metod při analýze potravin. Mezi prezentovanými pracemi bylo např. stanovení fosfolipidů s užitím TLC a HPLC, stanovení riboflavinu pomocí HPLC, mikrobiologické stanovení folacinu, spektrofotometrické stanovení jodu, stanovení kyseliny sorbové, kyseliny benzoové, sacharinu, aspartamu, acesulfamu, cyklamátu a kofeinu pomocí kapilární zónové elektroforézy, stanovení terpenických sloučenin ve víně pomocí GLC, imunochemická technika detekce buněk *S. enteritidis*. Senzorycké metody byly použity např. při hodnocení jakosti majonéz a tatarských omáček a při sledování autooxidace rostlinných olejů. V tomto případě byly porovnány s výsledky metody GLC.

Moderní trendy ve vývoji a výrobě potravin směřují k technologiím minimalizujícím nutriční ztráty. Na sympoziu byly prezentovány výsledky vývoje zařízení pro studenou sterilizaci roztoků na základě mikrofiltrace na keramických membránách. Pozitivní vliv na čerstvost má též aplikace vysokotlakého ošetření potravin, které je zajímavou alternativou běžného tepelného zákroku. Rovněž tepelná úprava masa pod vakuem umožňuje použít záhřev při nižší teplotě. Na tyto referáty volně navazovala sdělení o šetrné extrakci steviosidu a antokyanů z rostlinných surovin.

Pravidelnou součástí programu je diskuse o metodách senzoryckého hodnocení potravin spojená s praktickým hodnocením několika potravinářských výrobků. V letošním roce ohodnotili účastníci vzorky kávy, džusů, salámu a piva. Během sympozia se formou expozií prezentovaly firmy Alit, s.r.o. a Lambda Biomed, s.r.o.

Na sympoziu odezněla řada dalších zajímavých sdělení. Sborník souhrnů všech sdělení je dostupný ve VÚPP, Radiová 7, 102 31 Praha 10.

Příští, již XXIX. symposium je plánováno do Skalského dvora na dny 25.–27. 5. 1998.

Ing. Marie Holasová, Ing. Vlasta Fiedlerová

Instructions for authors

Manuscripts in duplicate should be addressed to: RNDr. Marcela Braunová, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic.

Manuscript should be typed with a wide margin, double spaced on standard A4 paper. Articles on **floppy disks** are particularly welcome. Please indicate the editor programme used.

Text

Full research manuscript should consist of the following sections: Title page, Abstract, Keywords, a short review of literature (without "Introduction" subtitle), Materials and Methods, Results, Discussion, References, Tables, Legends to figures. A title page must contain the title, the complete name(s) of the author(s), the name and address of the institution where the work was done, and the telephone, fax and e-mail numbers of the corresponding author. The Abstract shall not exceed 120 words. It shall be written in full sentences and should comprise base numerical data including statistical data. As a rule, it should not give an exhaustive review of literature. In the chapter Materials and Methods, the description of experimental procedures should be sufficient to allow replication of trials. Organisms must be identified by scientific name. Abbreviations should be used if necessary. Full description of abbreviation should follow the first use of an abbreviation. The International System of Units (SI) and their abbreviations should be used. Results should be presented with clarity and precision. Discussion should interpret the results. It is possible to combine Results and Discussion in one section. References in the text to citations comprise the author's name and year of publication. If there are more than two authors, only the first one should be named in the text, followed by the phrase "et al.". References should include only publications quoted in the text. They should be listed in alphabetical order under the first author's name, citing all authors, full title of an article, abbreviation of the periodical, volume number, year, first and last page numbers.

Tables and Figures

Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes. Figures should be referred solely to the material essential for documentation and for the understanding of the text. Duplicated documentation of data in figures and tables is not acceptable. All illustrative material must be of publishing quality. Figures cannot be redrawn by the publisher. All figures should be numbered. Photographs should exhibit high contrast. Both line drawings and photographs are referred to as figures. Each figure should contain a concise, descriptive legend.

Offprints: Forty offprints of each paper are supplied free of charge to the author.

Authors have full responsibility for the contents of their papers. The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

Obsah

Girotti S., Ferri E. N., Fini F., Righetti S., Bolelli L., Budini R., Lasi G., Roubal P., Fukal L., Hochel I., Rauch P.: Determination of microbial contamination in milk by ATP assay – Stanovení mikrobiální kontaminace mléka pomocí stanovení ATP	241
Pipek P., Dobiáš J., Soukup V.: The composition of modified atmosphere during storage of meat products – Složení modifikované atmosféry během skladování masných výrobků	249
Dostálová J.: Classification of legumes and legume products – Klasifikace luštěnin a výrobků z luštěnin	261
Turek B., Bárta I., Šmerák P., Kováčová E., Sedmínková M., Šestáková H.: Mutagenní aktivity některých látek rostlinného původu – Mutagenic activity of substances of plant origin	271
Koreňovská M., Zaušková P.: Chrom a nikel vo výrobnom procese syrov – Chromium and nickel in production process of cheeses	289
PŘEHLEDY – REVIEW	
Jankovský M., Staszková L., Holoubek J.: Lysozym – zajímavá bílkovina – Lysozyme – an interesting protein	297
Voldřich M., Pyš P., Opatová H.: Autenticita ovocných nápojů a metody identifikace falšování – Authenticity of fruit beverages, detection of falsification	307
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA – FROM THE SCIENTIFIC LIVE	
Houška M.: Konference a workshop „Modelling of Thermal Properties and Behaviour of Foods during Production, Storage and Distribution“ (Praha, 23.–25. června 1997)	317
Holasová M., Fiedlerová V.: XXVIII. symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin	319

Vědecký časopis POTRAVINÁŘSKÉ VĚDY ♦ Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha ♦ Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/251 098, fax: 242 539 38, e-mail: fofo@uzpi.cz ♦ Sazba: RNDr. Marcela Braunová, Nad Palatou 54, 150 00 Praha 5 ♦ Tisk: ÚZPI Praha ♦ © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2